Mutanten von Salmonella typhimurium mit temperatursensiblem DNS-Stoffwechsel

Versuch zur Charakterisierung

Wolfgang Schwarz

1979

Mutanten von Salmonella typhimurium mit temperatursensiblem DNS-Stoffwechsel

Versuch zur Charakterisierung

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Wolfgang Schwarz
aus
Bad Reichenhall
1979

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 1975 bis September 1978 am Genetischen Institut der Universität München unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Horst Schmieger durchgeführt.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Professor Dr. Horst Schmieger
2. Berichterstatter: PD Dr. Wolfhard Bandlow
Tag der mündlichen Prüfung: 30. Mai 1979

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I. EINLEITUNG 1

II. MATERIAL UND METHODEN 7
1. Material 7
2. Methoden 10
3. Abkürzungsverzeichnis 18

III. ERGEBNISSE 19
A) Pulsmarkierungsexperimente 19
1. Vorversuche 19
2. Pulskinetiken der DNS-, RNS- und Proteinsynthese 20
a) Einführung 20
b) Kontrollexperimente 24
c) Vergleich der Einbauraten bei 30° und 43° 26
d) DNS-Synthese in Abwesenheit von Proteinsynthese 30
e) Rückshiftexperimente mit und ohne CM ... 32
f) Doppelshiftexperiment 36
g) Replikation von Phagen-DNS 37
h) DNS-Abbau unter nicht-permissiven Bedingungen 41
B) Wachstumskinetiken und Morphologie 42
1. Lebendkeimzahlen in Minimalmedium 43
2. Zelltiter und Morphologie in Vollmedium ... 45
C) Wechselwirkung mit anderen Replikons 50
1. Integrative Suppression 50
2. Induktion von integrierten P22-Phagen 52

D) Kartierungsversuche 55
1. Bestimmung der Korekombinationshäufigkeiten 56
a) Konstruktion eines geeigneten Hfr-Spenders 56
b) Kreuzungen 57
c) Übertragung der Marker tsl3 und ts77 60
2. Chromosomentransfer 64
a) Stempeltechnik 64
b) Interrupted mating 67
3. F-Duktion 68
4. Versuche zur Identifizierung mit dem dnaB-Gen 70
a) Suppression durch Pl-Lysogenie 70
b) Kotransduktion mit malB 72

IV. DISKUSSION 75

V. ZUSAMMENFASSUNG 91

VI. LITERATURVERZEICHNIS..... 92

ABBILDUNGEN 102

LEBENSLAUF 118

I. EINLEITUNG

Die Vermehrung der Vererbungssubstanz, die Replikation der Desoxyribonucleinsäure (DNS) also, ist eines der zentralen Probleme der molekularen Biologie. Die Erforschung dieses grundlegenden Mechanismus des Lebens wird seit etwa 2 Jahrzehnten intensiv betrieben. Das Ergebnis sind immer komplizierter werdende Modelle, die aber noch nicht alle Fragen lösen können. Deshalb wurden Replikationssysteme gesucht und gefunden, die einem einfacheren, weniger komplexen Mechanismus folgen: Die Verwendung der Bakterien und später der noch einfacher zu untersuchenden Bakterio-Phagen gestattete die ersten Einblicke in Teilaspekte der DNS-Synthese (Kornberg 1974).

Am besten untersucht ist der Prozeß der eigentlichen DNS-Polymerisation, der Elongationsschritt im Gesamtablauf der Replikation. Die in-vitro-Untersuchungen des am häufigsten eingesetzten Organismus, des Phagen ΦX174, lassen auch Rückschlüsse auf die Bakterien-Replikation zu, da der Phage dabei die auch vom Bakterium verwendeten Enzyme mitbenutzt (Geider 1976, Mc Macken und Kornberg 1978).

Für die meisten Proteine, die in biochemischen Tests in gereinigter Form eingesetzt werden, ist der zugehörige Genort auf der Chromosomenkarte des Wirtsbakteriums Escherichia coli bekannt (Staudenbauer et al. 1978). Die Zuordnung gelang durch Komplementationstests mit Extrakten aus Bakterienmutanten, die in einem an der Replikation beteiligten Enzym defekt sind. Da Mutanten in einem für die Zelle so wichtigen Vorgang letal sind, wurden konditional-letale Mutanten isoliert,

in diesem Fall meist temperatursensible (ts-) Mutanten (Wechsler et al. 1973). Die Temperatursensibilität ist dabei das Ergebnis einer missense-Mutation, die zu einem Protein führt, das bei niedriger Temperatur (der permissiven T) aktiv, bei höherer Temperatur (der nichtpermissiven T) aber inaktiv ist.

Viele solcher dna_{ts}-Mutanten wurden von E.coli isoliert, charakterisiert und kartiert (z.B. Gross 1972). Dabei zeigte sich, daß sie in mindestens drei Gruppen einzuteilen sind:

1. in Mutanten der DNS-Vorstufen: nrdA (auch dnaF, ribo-Nukleotiddiphosphat-Reduktase), nrdB und andere;
2. Mutanten der Replikations-Initiation, die nach einem Temperaturshift in die nichtpermissive T. keine neuen Replikationsrunden initiieren können. Da bereits begonnene Runden noch zuende laufen, kommt die DNS-Synthese einer Kultur dieser Mutanten nur langsam zum Stillstand. Beispiele hiefür sind die Gene dnaA, dnaC/D, dnaH, dnaI, dnaP und rif (β-Untereinheit der RNA-Polymerase);
3. Mutanten der DNS-Strang-Elongation, die nach T.-shift die DNS-Synthese sofort anhalten: dnaB, dnaE(PolIII), dnaG (Primase), dnaZ (Elongationsfaktor II).

Noch nicht in diese Gruppen eingeteilt sind die Genorte dnaJ, dnaK, dnaL, dnaM, dnaQ und dnaS (Geider 1976, Sevastopoulos et al. 1977, Saito und Uchida 1978, Horiuchi et al. 1978 und Abbildung 31). In die DNS-Replikation greifen noch die Gene lig (Ligase), nalA und cou (Gyrase) (Higgins et al. 1978), polA (PolI), polB (PolII) sowie xth ein, bringen aber die DNS-Synthese nicht zum Stillstand (Geider 1976). Außerdem sind im in-vitro-System noch die

Proteine i und n und der Elongationsfaktor I beteiligt, für die noch keine äquivalenten Gene identifiziert wurden (Mc Macken und Kornberg 1978). Sicher sind auch in vivo noch andere Genprodukte zumindest in der Regulation der DNS-Synthese beteiligt, die sich beim in-vitro-Test nicht bemerkbar machen.

Bezeichnenderweise ist die Funktion fast aller Elongationsgenprodukte bekannt, da sie vom Phagen ΦX174 benötigt werden. Der Phage war wieder das entscheidende Testobjekt. Die bekannten Funktionen der Genprodukte sind bei der Aufzählung der dna-Gene angegeben (siehe oben).

Da der Phage keines der Initiationsgenprodukte braucht, konnte deren Funktion mangels eines Testsystems nicht aufgeklärt werden. Auch fast alle anderen Phagen von E.coli ebenso wie z.B. die F- und col-Plasmide (siehe Staudenbauer et al. 1978) kommen ohne die Initiationsgene des Wirtes aus. Dies zeigt, daß die Initiation ein für das Bakterienchromosom hochspezifischer Prozess ist, was ihre Funktion als Regulator der DNS-Synthese unterstreicht. Die Elongation dagegen scheint ein weit universellerer Prozess zu sein, der gestartete Replikationsrunden weitgehend unabhängig von der Herkunft der DNS weiterreplizieren kann. Trotzdem haben die großen T-Phagen (z.B. T4) eigene Genprodukte auch für die Elongation.

Eine Regulation der Initiation ist für die ØX174-Replikation wohl kaum notwendig, da dieser Phage die Wirtszellen lytisch infiziert, das heißt, daß er sich sofort nach der Injektion einer Bakterienzelle zu replizieren beginnt. Replikation findet also in jedem Fall statt (Kornberg 1974). Wie aber wird die Replikation der temperenten Phagen λ, Mu und P1 reguliert? Diese Phagen können die Bakterienzelle, die sie infiziert haben,

auch lysogenisieren. Sie werden dann entweder wie die Phagen λ und Mu mit dem Bakterienchromosom, in das sie integriert sind, passiv mitrepliziert, oder aber sie liegen wie der Phage P1 als selbständiges Replikon mit streng an die Chromosomenreplikation gekoppelter eigener Replikation vor.

Die Frage der Replikation der DNS-Synthese dieser Phagen wurde noch wenig untersucht. Soll die Phagenreplikation als Modell der komplizierten DNS-Replikation der Bakterien oder gar der Eukaryonten dienen, so muß man zunächst nach den Analogien dieser Replikationssysteme suchen, mit anderen Worten, nach den Genprodukten, die der Phage vom Wirt braucht.

Ein von Phagen und Wirt gemeinsam benötigtes Protein kann in vivo durch die Abhängigkeit der Phagenreplikation von temperatursensiblen Wirtsgenprodukten identifiziert werden. So zeigte sich, daß der Phage λ abhängig ist von allen untersuchten Elongationsgenprodukten, (dnaB, dnaE, dnaG, dnaZ), unabhängig dagegen von denen der Initiation (dnaA, dnaC, dnaP) (Truitt und Walker 1974). Ähnliche Ergebnisse mit wenigen Ausnahmen wurden auch für die F- und col-Plasmide gefunden (Staudenbauer et al. 1978).

Dies scheint nach Untersuchungen von Frau Schanda-Mulfinger in unserem Labor (in Vorbereitung) weitgehend auch auf den Salmonellaphagen P22 zuzutreffen, der mit den Phagen λ, Mu und P1 zur Klasse der temperenten Phagen gehört: Sie testete die Entstehung von Phagenpartikeln in dna_{ts}-Mutanten von E.coli und fand, daß generell auch dieser Phage von den Initiationsgenprodukten unabhängig zu sein scheint,

abhängig dagegen von den Elongations-Genprodukten. Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe der UV-Induktion von P22-lysogenen E.coli-Zellen und durch Infektion mit einem P22-λ-Hybridphagen gewonnen, da der Phage P22 an E.coli-Zellen nicht adsorbieren und sie deshalb nicht infizieren kann.

Die Abhängigkeit der Phagenreplikation von dna-Genprodukten in E.coli auf Salmonella zu übertragen, ist aber nicht ohne weiteres gerechtfertigt. Denn
1. ist die UV-Induktion nicht unbedingt mit der Infektion vergleichbar, was die Beteiligung früher Gene betrifft, die auch an der DNS-Replikation beteiligt sind (Susskind und Botstein 1978), und
2. läßt die Abhängigkeit oder Unabhängigkeit von dna-Genprodukten in E.coli wohl nicht unbedingt auf die gleiche Abhängigkeit oder Unabhängigkeit von den analogen dna-Genprodukten in Salmonella typhimurium schließen, da die Wechselwirkung zwischen Wirtsgenprodukt und Phagen-DNS oder -Genprodukt sicher äußerst sensibel auf Strukturunterschiede der Proteine zwischen den Genera E.coli und Sal.tm. reagiert.

Um diese Einschränkungen und Unsicherheiten bei der näheren Charakterisierung der Phagenreplikation zu umgehen, ist es notwendig, die Abhängigkeit von Wirtsgenprodukten in dna_{ts}-Mutanten von Sal.tm. zu untersuchen. Aber nur zwei solcher dna-Mutanten wurden bisher isoliert und kartiert: eine dnaA-Mutante (Bagdasarian et al. 1972) und eine dnaC-Mutante (Spratt und Rowbury 1971). Da die Genkarten von E.coli und Sal.tm. bis auf einige wenige Genorte und Inversionen identisch sind (Sanderson und Hartmann 1978),

entspricht eine Analogie im Genort wohl auch einer Analogie in der Funktion, was für das dnaA-Genprodukt zumindest weitgehend bestätigt werden konnte (Bagdasarian et al. 1977).

Leider war uns nur die dnaA-Mutante verfügbar. In dieser Mutante konnte die Unabhängigkeit der Phagenreplikation vom dnaA-Genprodukt nachgewiesen werden (Backhaus und Schmieger, in Vorbereitung). Andere dna_{ts}-Mutanten von Sal.tm. zu charakterisieren war die Aufgabe dieser Arbeit. Ich konnte dabei von über 100 ts-Mutanten ausgehen, deren Isolierung ich mit Hilfe einer Autoradiographiemethode (nach Wechsler et al. 1973) in meiner Diplomarbeit (1975) beschrieben habe. Eine nähere Charakterisierung dieser Mutanten kann auch einige neue Aspekte der bakteriellen Replikation aufklären. Denn trotz der nahen Verwandtschaft zwischen Sal.tm. und E.coli ist möglicherweise die Häufigkeitsverteilung auftretender ts-Mutationen wegen abweichender Proteinstruktur unterschiedlich, sodaß evtl. Genorte identifiziert werden können, die bei E.coli noch nicht gefunden wurden.

Die Nomenklatur der hier beschriebenen ts-Mutanten von Sal.tm. entspricht noch nicht der internationalen Schreibweise, da dies die Kenntnis über den Genotyp voraussetzen würde. Die vorliegende Arbeit soll ein Beitrag dazu sein, diesen näher zu beschreiben.
Alle Abbildungen (außer Abb. 1) sind aus praktischen Gründen dem Ende des Textteiles angefügt.

II. MATERIAL und METHODEN

1. Material

a) Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
	Escherichia coli	
C600	F^-, ton A21, thr-1, leu-6, thi-1, lacY, supE44	Wackernagel
CO3	HfrH, thi-1, malB29, relA1, $^-$	CGSC 4804
CO9	F'141 Auxotrophien nicht angegeben	CGSC 4248
C10	F'104 "	CGSC 4251
C11	F'111 "	CGSC 4258
C12	F'112 "	CGSC 4260
C13	F'142 "	CGSC 4279
C14	F'129 "	CGSC 4280
C15	F'254 "	CGSC 4282
C16	F'116 "	CGSC 4254
C17	F'148 "	CGSC 4302
dnaB	dnaB70 "	d'Ari
dnaE	dnaE486 "	Wechsler
	Salmonella typhimurium	
LT-2	WT prototroph	dieses Labor
T4/2	thy^-	"
TB37	dnaA1, his3594, thy1152	Bagdasarian
SM4023	trp8, recA	dieses Labor
DB5065	TC^R, Auxotrophien nicht angegeben	Botstein
SA 163	pyr 210, F'13 lac	Sanderson
HfrA	HfrA, hisD23, gal50	"
HfrB	HfrB2, proA26	"
HfrK3	HfrK3, serA13, rfa3058	"
HfrK4	HfrK4, " "	"
HfrK5	HfrK5, " "	"
HfrK10	HfrK10, serA15, pur268	"
FS	FS21, Hfr, leu256	"
W112	aus HfrK3: Hfr, serA, rfa, aux	Eigenisolat
W109	F'254 (aus C15 und SM4023)	"
W106	F^-, polA, araB9, leu, thy, hisD36, proC90, $hsp_{LT}{}^{r-}m^+$, Str^R	"

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
mal	malB114, cysG	Sanderson
SA4 S	leu 126, araB9, Str^R	"
purD S	purD24, Str^R	"
SM1020 S	trpA52, cysB12, pyrF146, Str^R	"
SM1021 S	cysE1709, pyrE125, xylE, Str^R	"
SM1025	metA22, trp2, his 1009, xyl, Str^R	"
SM1026	metE338, ilv401, Str^R	"
SM1028 S	trpB4, cysB12, Str^R	"
SM1061	trp8, Str^R	"
SM 1093 S	pyrD, ura, Str^R	"
SM1095 S	arg E, Str^R	"
SM1101 S	pheA, Str^R	"
SM1103 S	metG, ara, Str^R	"
SM4412	LT7, $hsd_{LT}33$, $hsd_{SA}20$, proC90, Str^R	Colson
endo S	endoI, cysA, his, Str^R	Bade
	Shigella dysenteriae	
SH 16	WT prototroph	d'Ari

Ein S hinter der Stammbezeichnung bedeutet, daß von dem Str-sensiblen Originalstamm eine spontane Str-resistente Mutante (siehe Abschnitt "Methoden") isoliert wurde.
Die ts-Mutanten und die in dieser Arbeit isolierten Stämme sind in der Tabelle nicht aufgeführt.

b) Phagenstämme

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
	E.coli-Phagen	
T1, T4, T6, T7	Wildtyp	
P1CM	"	d'Ari
P1CMcl100	cts-Mutante	"
P1CMbac-1	konstitutiv für dnaB-Analog	"
P1CMbac-ban	defekt in dnaB-Analog	"
MS2	Wildtyp	Hofschneider

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
	Salmonella-Phagen	
H1	Wildtyp P22	dieses Labor
H5	c2⁻, Klarplaquemutante von H1	"
erf	P22, defekt in erf	"
HT12/4	c2⁻, erhöhte Transduktionsfähigkeit (Schmieger 1972)	"
HTint	int⁻, aus HT104/2 (Schmieger 1972)	Roberts
FO	Wildtyp	Bagdasarian

c) Medien und Lösungen

NB-Medium: 8g Bacto-Nutrient-Broth, 5g NaCl, aqua dest. ad 1000 ml

NA-Platten: NB + 1,5% Agar. Vollmedium, auch für Antibiotika-Tests mit 20 ug CM/ml, 200 µg Str/ml oder 50 µg TC/ml

TCG-Medium: Minimalmedium
TCG-Salze: 20 ml NaCl (25%), 16 ml Na_2SO_4 (0,1 M) 32 ml KH_2PO_4 (0,1 M), 14 ml $CaCl_2$ (1 M), 3 ml $FeCl_3$ (0,01 M);
TCG-Medium: 0,85 ml TCG-Salze, 100 ml Tris (p_H 7,4, 0,1 M), 0,5 ml Cas acids (10%), 0,5 ml Glucose (20%), 0,1 ml $MgSO_4$ (1,0 M);

M9-Platten: Minimalmedium
15g Bacto-Agar + 880 ml H_2O dest., autoklavier. + 100ml 10 x M9-Salze + 10 ml 20% Glucose + 10 ml $MgSO_4$ (0,1 M);
Zugabe von 20 µg der benötigten Aminosäuren und Vitamine. Für Zuckermarker statt Glucose den zu testenden Zucker und TTC (5g/l);

Pen-Medium: 17,5 g/l Bacto-Antibiotic-Medium 3

Weichagar (BA): 5g NaCl, 7g Bacto-Agar, 8g Bacto-Nutrient-Broth, aqua dest. ad 1000ml.

Verdünnungsflüssigkeit (VF): 1g Trypton, 10g NaCl, aqua dest. ad 1000 ml.

Adsorptionspuffer für P1-Phagen: 0,1 M Tris-HCl-Puffer
p_H = 7,6 + 2,5 x 10^{-3}M $CaCl_2$ + 3 x 10^{-3}M $MgCl_2$
Antibiotikalösung: Chloramphenicol 10 mg/ml in 99% Äthanol;
Tetracyclin 2,5 mg/ml in 50% Äthanol;
Streptomycin 50 mg/ml in H_2O.
10 x M9 Salze: 150g Na_2HPO_4 x 12 H_2O, 30g KH_2PO_4, 5g NaCl,
10g NH_4Cl, H_2O dest. ad 1000 ml;

d) Chemikalien:

Agar, Nutrient-Broth, PEN (Antibiotik-Medium 3) von Difco, Thymidin von Fluka, PPO und dimethyl- POPOP von Packard, Frankfurt; [6-^{3}H]-Thd (24 Ci/mmol; 99 mCi/mg), [5,6-^{3}H]-Urd (49 Ci/mmol, 200 mCi/mg) und L-[4,5-^{3}H]-Leu (1mCi = 2,4 µg) von Amersham-Buchler, Braunschweig.
Membranfilter (BA, Porengröße 45 µm) von Sartorius.

2. Methoden

a) Übernachtkulturen (ÜK):

Von einer Dauerkultur des jeweiligen Stammes wird im angegebenen Medium (meist NB) eine 1/100-Verdünnung hergestellt und im Rollbebrüter über Nacht bebrütet.

b) log-Kulturen (Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase
Eine frische ÜK wird in dem angegebenen Medium 1/500 verdünnt und solange bei 37° (wenn nicht anders angegeben) belüftet, bis die Kultur eine Zelldichte von etwa 2 x 10^8/ml erreicht hat(als log-Phase bezeichnet). Die Zelldichte wird mikroskopisch kontrolliert.

c) Phagenlysate

Flüssiglysate für P22-, MS2-, FO- und T-Phagen:
Eine NB-Kultur des Wirtsbakteriums in der logarithmischen Wachstumsphase (log-Kultur) wird mit einer Infektionsmultiplizität von 1 Phagen pro Bakterium (moi = 1) bei Trübplaquephagen (HTint, erf, H1) bezw. moi = 10 bei Klarplaquephagen (H5, HT12/4, FO, MS2 und T-Phagen) beimpft und unter Belüftung ca 80 min inkubiert. Dann wird Chloroform zur vollständigen Lyse und Abtötung der Bakterien zugegeben und 10 min weiterbelüftet, Zelltrümmer und ganze Zellen abzentrifugiert (4000g, 10 min), die Sterilität des Lysates überprüft und der Phagentiter bestimmt (siehe unten).
Als Wirtsbakterien werden verwendet: für P22- und FO-Phagen der Salmonella-typhimurium-Stamm LT-2, soweit nicht anders angegeben; für MS2 auf Sal.tm. der Stamm SA163, auf E.coli der Stamm C03; für die T-Phagen der E.coli-Stamm C600.

Plattensysate von P1-Phagen:
3×10^8 Wirtsbakterienzellen (C600 für E.coli, eine der P1-sensiblen Mutanten von Sal.tm. für Salmonellen) werden mit ca 5×10^6 Phagen und 0,1 ml Adsorptionspuffer 20 min lang ruhig bei 37° stehengelassen, um Adsorption der Phagen zu ermöglichen. Nach Zugabe von 2 ml PEN-Medium und 4 ml geschmolzenem Weichagar (BA) wird das Gemisch auf dicke, feuchte NA-Platten gegossen und 5 - 7 Std. bei 37° inkubiert. Danach wird die Weichagarschicht gesammelt, mit ca 5 Tropfen Chloroform vorsichtig gemischt und nach 10 min abzentrifugiert (5 min, 4000 g). Die Sterilität des Überstandes wird überprüft und der Phagentiter bestimmt (siehe unten).

Flüssiglysate von P1-Phagen durch Hitzeinduktion von P1CMcl100-lysogenen Salmonellenstämmen:
Eine log-Kultur des lysogenen Stammes wird bei 30° bis zum Titer von 5 x 10^8 Zellen/ml gezogen, dann zur Induktion 50 min bei 43° inkubiert und zur Reifung der P1-Phagen 110 min bei 30° weiterbelüftet. Die weitere Prozedur folgt dem Protokoll "Flüssiglysate für P22-Phagen".

d) Bestimmung der Phagentiter:

für P22-, FO-, MS2- und T-Phagen:
2 ml geschmolzener BA werden mit 2 x 10^8 Indikatorbakterien (entsprechend den Wirtsbakterien bei den Lysaten) und 0,1 ml einer passenden Verdünnung des Phagenlysates in VF gemischt und auf NA Platten gegossen. Nach Bebrütung über Nacht bei 37° kann man die entstandenen Phagenplaques in dem dichten Bakterienrasen auszählen.

für P1-Phagen:
3 x 10^8 Indikatorbakterien (C600 für E.coli-gezogene Lysate, SH16 für Sal.tm.-gezogene Lysate) und 0,1 ml einer entsprechenden Verdünnung des Phagen-Lysates in VF werden mit 0,1 ml Adsorptionspuffer 20 min stehengelassen, mit 1 ml PEN-Medium und 3 ml BA gemischt, auf dicke, feuchte NA-Platten gegossen und bei 37° über Nacht inkubiert. Dann können die Phagenplaques ausgezählt werden.
Da die Plaques des Phagen P1 auf sensiblen Salmonellenstämmen nur sehr schwierig auszuzählen sind, wurde zur Titerbestimmung der nichtrestringierende Shigellastamm SH16 verwendet, auf dem die Plaques gut sichtbar sind. Die auf Shigella bestimmten Titer sind ein wenig niedriger als die auf Sal.tm. bestimmten.

e) Transduktion mit P22-Phagen:

Ein auf den Spenderbakterien gezogenes HT-Phagenlysat (HTint oder HT12/4) wird 10 min mit 0,1 ml einer ÜK des Empfängerbakteriums bei 37° (30° bei ts-Mutanten) inkubiert (moi = 10) und auf Selektivmedium plattiert. Nach 2 - 3 Tagen Bebrütung können die Platten ausgewertet werden.
Die Transduktion von ts-Mutanten zum Wachstum auf M9-Platten+Thd wird mit einem HTint-Phagenlysat durchgeführt, das auf dem ts^+-Wildtypstamm T4/2 (WT T4/2) gezogen wurde (als HTint:T4/2 bezeichnet). Die Transduktanten werden über Einzelkolonien gereinigt und durch Plattierung auf Minimalmedien (M9 mit und ohne Thd) bei 30° und Vollmedium (NA) bei 43° auf den thd- bezw. ts-Marker getestet. Außerdem sollen die Transduktanten prophagenfrei sein (Test auf Lysogenie siehe unten).
Zur Transduktion der Mutante ts13 zur Tetracyclin(TC)-Resistenz mit dem Phagenlysat HTint:5065(TC^R) werden die Transduktanten auf NA-Platten mit Zusatz von 50 µg TC/ml selektiert und dann auf die Marker TC^R, ts^-, thd^-, sowie auf Lysogenie geprüft.

f) Strichtest auf Sensibilität für H5-, FO- und T-Phagen.

Auf einer NA-Platte wird mit einer Pipette ein Strich mit etwa 0,01 - 0,02 ml eines hochtitrigen Phagenlysates gezogen; nach dem Eintrocknen werden quer dazu ÜK's der Bakterien ausgestrichen, die bei Sensibilität jenseits des Phagenstriches weglysiert werden, also nicht mehr wachsen. Bis zu 15 verschiedene Bakterienkulturen können so pro Platte getestet werden.

g) Tropftest auf MS2-Phagen-Sensibilität:

Sensibel sind F'- und Hfr-Stämme von E.coli und Sal.tm., da der Phage MS2 nur an die F-Pili dieser Bakterien adsorbieren kann. Nicht alle F'- und Hfr-Stämme von Sal.tm. aber sind in diesem Test als sensibel erkennbar (Sanderson et al. 1972).

Ein Tropfen einer ÜK des zu testenden Bakterienstammes wird mit BA gemischt und plattiert. Nach dem Erkalten wird ein Tropfen eines hochtitrigen MS2-Lysates (ca 10^{11}/ml) daraufgetropft. Nach Bebrütung bei 37^{o} (30^{o} für ts-Mutanten) ist der Bereich dieses Tropfens gegenüber dem umgebenden Bakterienrasen aufgehellt, wenn der Stamm sensibel war.

h) Prüfung auf P22-Lysogenie:

2 Tropfen einer ÜK des Bakteriums LT-2 werden mit 2 ml BA gemischt und plattiert. Die zu testenden Übernachtkulturen werden daraufgetropft. Nach Bebrütung bei 37^{o} kann man einen Lysishof am Rande des Tropfens einer lysogenen Kultur sehen.

i) Test auf MMS-Sensibilität:

1,5 ml BA werden mit Methan-methyl-sulfonat (MMS) auf eine NA-Platte gegossen und ca 1 Std. stehengelassen, damit das MMS in den Agar eindiffundieren kann (Endkonzentration 400 µl MMS/ml). Danach können die zu testenden Stämme aufgetropft werden.
MMS-sensible Stämme (z.B. polA- und recA-Mutanten) werden völlig abgetötet, $polA^{+}$ oder $recA^{+}$-Stämme sind MMS-resistent.

k) Isolierung Streptomycin-resistenter Stämme (Str^{R}):

0,2 ml einer Bakterien-ÜK werden auf einer NA-Platte ausgestrichen, auf deren einer Seite ein 0,2 ml-Tropfen einer Streptomycin-(Str)-Lösung (50 mg/ml) eingetrocknet

ist. Nach 2 Tagen Bebrütung bei 37^{o} (bei ts-Mutanten 30^{o}) sind Str-resistente Kolonien in dem Hemmhof des Str-Areals gewachsen. Sie werden abisoliert, gereinigt und auf die Marker Str^{R}, ts und die Auxotrophien getestet. Es wurde besonders darauf geachtet, daß die Stämme nicht Str-bedürftig geworden sind.

l) Isolierung Pl-sensibler Sal.tm.-Stämme:

Ca 5 x 10^{8} Bakterien werden mit einer möglichst hohen moi eines der angegebenen Pl-Phagen 30 min mit Adsorptionspuffer inkubiert und dann auf NA -Platten mit 20 µg/ml Chloramphenicol (CM) plattiert. Nach 2 - 4 Tagen können lysogene Zellen abisoliert werden, die CM-resistent sind, weil die hier verwendeten Pl-Phagen den CM-Resistenzmarker tragen. Nach einigen Generationen Wachstum in Vollmedium ohne CM ist ein Teil der Zellen wieder CM-sensibel geworden: diese Zellen haben den Pl-Phagen wieder verloren. Sie sind Pl-sensitiv und meist auch P22-sensitiv, aber immer FO-resistent (Methode nach Mojica-a 1975 und Bagdasarian, mündliche Mitteilung).

m) F-Duktion und Chromosomentransfer (modifiziert nach Sanderson et al. 1972 und Low 1972):

Die Empfängerstämme sind alle Streptomycin (Str)-resistent, die Spenderstämme Str-sensibel, außer wo dies anders vermerkt ist.

In Flüssigmedium mit Hfr- und F'-Stämmen:

In PEN-Medium gezogene log-Kulturen der benötigten Spender- und Empfängerstämme werden im Rollbebrüter gezogen. Diese Kulturen werden im Verhältnis 1 Empfänger- zu 10 Spenderzellen gemischt, 1 : 1 in vorgewärmtem PEN-Medium verdünnt und in dünner Schicht ruhig bei 37^{o} (30^{o}) stehengelassen, bei F-Duktion und Chromosomentransfer über Nacht; beim Versuch zum "interrupted mating" werden zu den angegebenen Zeiten Proben entnommen. Nach der

Entnahme werden die Proben zur Trennung der Zellen möglichst scharf eine Minute mit einem Vortex-Mixer geschüttelt und sofort auf Selektivmedium plattiert (200 µg/ml Str in M9-Medium für Auxotrophien und in NA-Medium bei43° für ts-Marker). Bei 30° müssen die Platten manchmal 5 Tage inkubiert werden.

Auf Agarplatten mit Hfr -Stämmen:

Auf Selektivplatten (wie im vorigen Abschnitt, aber ohne Str) werden o,1 ml einer Empfänger-ÜK vorplattiert. Darauf werden Hfr-Kulturen gestempelt (replica plating), die 4 - 5 Std. bei 37° auf NA-Platten bis zur log-Phase gewachsen sind.Nach einer Stunde Inkubation bei 37° (30°) wird mit einem Zerstäuber 2%ige Str-Lösung aufgesprüht, bis die Plattenoberfläche nichts mehr aufnimmt. Dann werden die Platten mindestens 2 Tage bei der angegebenen Temperatur bebrütet. Im Stempelareal wachsen die Rekombinanten.
Die Häufigkeit des Chromosomentransfers ist mit dieser Methode viel höher als in Flüssigmedium.

n) Pulsmarkierung (nach Backhaus 1976)

log-Kulturen des entsprechenden Stammes werden in TCG-Medium mit 2 µg/ml Thd belüftet und den angegebenen Versuchsbedingungen ausgesetz (CM-Zugabe, Temperaturwechsel). Zu verschiedenen Zeiten werden Proben von 0,2 ml entnommen, mit 0,1 ml des Inkubationsmediums (TCG-Medium + 10 µCi ^{3}H/ml) gemischt und bei der Versuchstemperatur inkubiert. Nach 2 min(5 min bei der Phagen-DNS-Synthese) werden 5 ml eiskalte Trichloressigsäure (5%ig) dazugegeben und die Proben mindestens 60 min mit Eis gekühlt,

danach über Membranfilter (siehe Material) abgesaugt, mit eiskaltem Wasser gewaschen, getrocknet und im Toluol-szintillator (5g PPO, 0,3g dimethyl-POPOP ad 1000 ml Toluol) die eingebauten ^{3}H-cpm gemessen. Zur DNS-Synthesemessung wird ^{3}H-Thd, zur RNS-Synthesemessung ^{3}H-Urd und zur Proteinsynthesemessung ^{3}H-Leu verwendet.

o) Markierung zur Stabilitätsmessung der DNS (pulse chase):

Eine log-Kultur der ts-Stämme in 30° TCG-Medium (siehe Material), supplementiert mit 2 µg Thd/ml und je 20 µg/ml der benötigten Aminosäuren, wird 15 min lang mit 10 µCi ^{3}H-Thd/ml bei 30° weiterbelüftet (pulse). Dann wird diese Kultur 1 : 1 mit TCG-Medium mit 400 µg/ml Thd verdünnt (chase) und die Hälfte dieser Kultur sofort in 43,5° weiterbelüftet, die andere Hälfte bei 30° belassen. Zu bestimmten Zeiten werden aus beiden Kulturen 0,2 ml-Proben entnommen, in 5 ml eiskalte TCA pipettiert und dann zur Messung weiterbehandelt, wie bei der Puls-markierung beschrieben.

3. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

cpm	count per minute; radioaktive Zerfälle, gemessen als Impulse im Szintillationszähler
CM	Antibiotikum Chloramphenicol
dna_{ts}	temperatursensibel im DNS-Stoffwechsel
DNS	Desoxyribonucleinsäure
E.coli	Escherichia coli
Leu	Leucin
LKZ	Lebendkeimzahl: koloniebildende Zellen pro ml
log-Kultur	wachsende Bakterienkultur in der logarithmischen Wachstumsphase
moi	Infektionsmultiplizität: Phagenzahl pro Zelle
RNS	Ribonucleinsäure
Sal.tm.	Salmonella typhimurium
Str	Antibiotikum Streptomycin
T.	Temperatur
TC	Antibiotikum Tetracyclin
thd	Thymidin
ts	temperatursensibel (meist bei 43^{o})
TTC	2,3,5-triphenyl-Tetrazoliumchlorid
ÜK	stationäre Bakterienkultur, die über Nacht zur größten Dichte gewachsen ist (LKZ in Vollmedium etwa 2×10^{9}/ml)
Urd	Uridin
WT	Wildtyp

Die Bezeichnung der Genorte folgt der allgemein üblichen Nomenklatur (Bachmann et al. 1976, Sanderson und Hartmann 1978).

aux^{-} bezeichnet eine nicht näher charakterisierte Auxotrophi

III. ERGEBNISSE

A) Pulsmarkierungsexperimente

1. Vorversuche zur Auswahl der temperatursensiblen Mutanten

In meiner Diplomarbeit habe ich die Isolierung von temperatursensiblen Mutanten aus dem Stamm T4/2 beschrieben (Schwarz 1975). Die benutzte Anreicherungs- und Isolierungsmethode sollte mit erhöhter Wahrscheinlichkeit schnellabschaltende DNS-Synthesemutanten liefern. Vorversuche hatten ergeben, daß sich die Mutanten mit Hilfe der gegenseitigen Transduktion in mindestens 36 Gruppen einteilen lassen, und daß zumindest bei einem Teil der Mutanten die DNS-Synthese temperatursensibel geworden ist.

Um die T.-Sensibilität genauer zu überprüfen, wurden aus der großen Zahl von 110 isolierten ts-Mutanten nach weiteren Vorversuchen 8 zur genaueren Charakterisierung ausgewählt. Die Kriterien für die Auswahl waren:
1. möglichst weitgehende Abschaltung des ^{3}H-Thd-Einbaus und gleichzeitige Aufrechterhaltung des ^{3}H-Leu-Einbaus bei 43^{o};
2. Sensibilität für den Phagen H5 im Strichtest;
3. Vermehrung bis zu hoher Zelldichte bei 30^{o} in dem Minimalmedium, das für die Pulsversuche verwendet wurde;
4. möglichst geringes Wachstum und möglichst wenig Rückmutanten auf Vollmedium in 43^{o};
5. Zugehörigkeit zu verschiedenen Transduktionsgruppen; z.B. steht die Mutante ts80 stellvertretend für 5 weitere Mutanten.

Die Natur des temperatursensiblen Defektes dieser verbleibenden 8 Mutanten sollte nun überprüft werden. Zunächst hatten sie alle durch die starke Mutagenese noch zusätzliche Auxotrophien. Um einen möglichst einheitlichen genetischen Hintergrund für die ts-Mutationen zu erhalten und möglichst gutes Wachstum in dem Minimalmedium zu erreichen, das für die Pulsversuche verwendet wird, wurden sie mit einem auf dem Wildtyp T4/2 gezogenen HTint-Phagen (HTint:T4/2) transduziert (siehe "Methoden"). Dabei wurden solche Transduktanten isoliert, die 1. den thd-Marker des Ausgangsstammes T4/2 nicht verloren haben, 2. temperatursensibel sind und 3. keinen P22-Prophagen enthalten: die Mutantenstämme ts7, ts13, ts40, ts66, ts77, ts80, ts87 und ts107 sind das Ergebnis dieser Transduktionen. Sie werden in allen weiteren Versuchen benutzt. Die Mutanten ts40, ts77, ts80 und ts87 gehören zu jeweils unterschiedlichen Transduktionsgruppen, die anderen lassen sich nicht in Gruppen einteilen (Schwarz 1975). Diese Mutanten wurden ausführlichen Puls-, Komplementations- und Kartierungsexperimenten zur Charakterisierung des temperatursensiblen Defekts unterzogen, die im folgenden beschrieben werden.

2. Pulskinetiken der DNS-, RNS- und Proteinsynthese

a) Einführung

Fast alle Autoren, die dna_{ts}-Mutanten beschreiben, verwenden zur Charakterisierung des Verlaufs von DNS-, RNS- und Proteinsynthesen akkumulierende Messungen des Einbaus von ^{3}H-Thd, ^{3}H-dUrd und ^{3}H-Leu (z.B.Wechsler et al. 1973, Bagdasarian et al. 1972, aber auch neuere Arbeiten z.B.

Sevastopoulos et al. 1977, Saito und Uchida 1978). Bei dieser Art der Messung ist die Synthese durch Zunahme des radioaktiv markierten Materials charakterisiert, deshalb macht sich sogar eine drastische Änderung zwischen Synthese und Nichtsynthese (z.B. durch Temperaturwechsel bei dna_{ts}-Mutanten oder durch Hemmstoffzugabe) nur in einer weiteren Zunahme oder Nicht-Zunahme der eingebauten Radioaktivität bemerkbar; kurzzeitige oder sehr geringe Änderungen der Einbauraten können daher nur sehr schwer erkannt werden.

Deshalb habe ich zur Charakterisierung der DNS-, RNS- und Proteinsynthese der neuisolierten Mutanten eine andere Methode angewandt: Kinetiken mit Hilfe von Kurzzeitmarkierungen (Pulsmarkierungen). Dabei wachsen die Kulturen unter den gewünschten Bedingungen ohne Radioaktivität. Zu bestimmten Zeiten werden Proben entnommen und zur Markierung mit Radioaktivität nur kurze Zeit (meist 2 min) inkubiert (Puls). Die in einem solchen Puls eingebaute Radioaktivität ist somit ein direktes Maß für die zum Zeitpunkt des Pulses in der Bakterienkultur herrschende Syntheseaktivität des untersuchten Stoffwechselweges. Die Aufeinanderfolge der Meßpunkte gibt den Verlauf der Syntheserate in den Zellen wieder, der direkt mit dem Kurvenverlauf korreliert ist: ein Ansteigen der Kurve bedeutet auch Ansteigen der DNS-Syntheserate, ein waagrechter Kurvenverlauf bedeutet Gleichbleiben.

Bei den präsumptiven dna_{ts}-Mutanten wurden so die Syntheseraten unter folgenden Versuchsbedingungen gemessen:

-- 30° als Kontrolle für die wachsende Kultur unter permissiven Bedingungen (DNS-, RNS-, Proteinsynthese).
-- Temperaturshift nach 43° als nicht-permissive Bedingung. Wie schnell und wie stark wird welcher Syntheseweg inaktiviert? (DNS-, RNS-, Proteinsynthese).
-- 30° unter Zugabe von Chloramphenicol (CM). Es findet keine Proteinsynthese statt, die Zellen teilen sich nicht mehr, die Neuinitiation der DNS-Synthese ist stark gehemmt (wenn auch nicht völlig, Geider 1975). Sie sollte also der Abschaltkinetik einer Initiationsmutante gleichen. Wie sehen im Vergleich dazu die Abschaltkinetiken der DNS-Synthese bei 43° aus?
-- Temperaturshift von 43° nach 30° (nicht permissive zu permissiver T., Rückshift): dabei sollte nach einiger Zeit wieder die Syntheserate der bei 30° verbliebenen Kultur erreicht werden, wenn nicht die Zellen in einer lebenswichtigen Funktion irreversibel geschädigt sind (DNS-, Proteinsynthese).
-- Rückshift in Gegenwart von CM: ist das für die Abschaltung verantwortliche Protein irreversibel geschädigt oder ein Proteinsynthese-abhängiger Schritt der DNS-Synthese betroffen, so steigt die DNS-Syntheserate bei Rückshift + CM nicht wieder an (DNS-, Proteinsynthese).
-- Doppelshift-Experiment 43° - 30° - 43°: ist die beim Rückshift wiedererlangte DNS-Syntheseaktivität über einige Zeit stabil? (Neuinitiation). Oder gleicht die Abschaltkinetik beim zweiten shift derjenigen des ersten shifts?
-- Phagen-DNS-Synthese:
Findet bei nichtpermissiver T. Phagen-DNS-Synthese statt?

Als Kontrolle für jede Methode wurde zusätzlich zu den neuisolierten Mutanten der WT T4/2 , von dem alle Mutanten abstammen (dna^+), sowie die schon gut charakterisierte dnaA-Mutante TB37 mitgemessen. Der besseren Übersichtlichkeit halber werden die Ergebnisse der einzelnen Mutanten bei jedem Versuch zusammengefaßt und nicht einzeln dargestellt.

Der Stamm T4/2 und alle von ihm isolierten ts-Mutanten, sowie auch der Stamm TB37, haben einen Defekt in der Thymidin-Synthetase (thyA-Gen). Stämme mit diesem Defekt nehmen alles Thymidin, das sie zur DNS-Synthese benötigen, aus dem Medium auf und sind daher für Markierungen mit radioaktivem Thymidin sehr gut geeignet. Der Einbau von radioaktivem Leucin war sehr schlecht, da keiner der Stämme einen analogen Defekt im Stoffwechselweg des Leucins hatte. Dagegen wurde markiertes Uridin in ausreichender Menge eingebaut.

Zu den einzelnen Experimenten werden in den folgenden Kapiteln die Einbaukinetiken gezeigt, die in halblogarithmischem Maßstab aufgetragen sind. In Tabellenform werden die wichtigsten Daten zusammengefaßt. Halbierungszeit (bezw. Verdopplungszeit) bedeutet die Zeit in min, in der die Syntheserate auf die Hälfte sinkt (bezw. auf das Doppelte ansteigt), vom erreichten Maximum (Minimum) an gemessen. Die Tabelle "90% der Inaktivierung" gibt die Zeit in min an, in der die Syntheserate auf 90% der Differenz zwischen Maximum und Minimum gesunken ist. Dies ist als Maßstab für die Zeit bis zur maximalen Inaktivierung sicher besser geeignet als die Zeitangabe des absolut erreichten Minimums, da die Inaktivierung sich oftmals nach Beendigung des Versuchs noch fortzusetzen scheint.

b) Kontrollexperimente zu den Pulsen:

Für die Durchführung einiger Pulsversuche ist es notwendig, die Proteinsynthese vollständig zu hemmen und die DNS- und RNS-Syntheseraten zu verfolgen. Um die Geschwindigkeit der Wirkung von CM und die optimale Hemmkonzentration zu bestimmen ist ein Vorversuch notwendig. Ebenso muß durch einen Vorversuch sichergestellt werden, daß durch ^{3}H-Urd-Markierung nur die RNS markiert wird. Die DNS-Markierung durch ^{3}H-Thd wird durch die T.-Abschaltung in einem späteren Abschnitt geprüft, die Proteinmarkierung durch ^{3}H-Leu wird im Vorversuch der CM-Wirkung gleichzeitig kontrolliert.

Abschaltung der Proteinsynthese durch CM:

Eine log-Kultur des Stammes T4/2 wurde bei der T. von 37^{o} mit ^{3}H-Leu zur Bestimmung der Proteinsyntheseraten mit 0, 20, 50 und 150 µg/ml CM gepulst. Die Rate ohne CM wurde gleich 100% gesetzt (4500 cpm) (Abb. 1). Die folgende Tabelle drückt das in Abb. 1 dargestellte Ergebnis in Zahlen aus.

Tabelle 1:

µg CM	1'	20'	min nach CM-Zugabe
20	8	6	% Restaktivität des ^{3}H-Leu-Einbaus nach Abzug von 160 cpm Nullwert
50	5	2	
150	3	1	

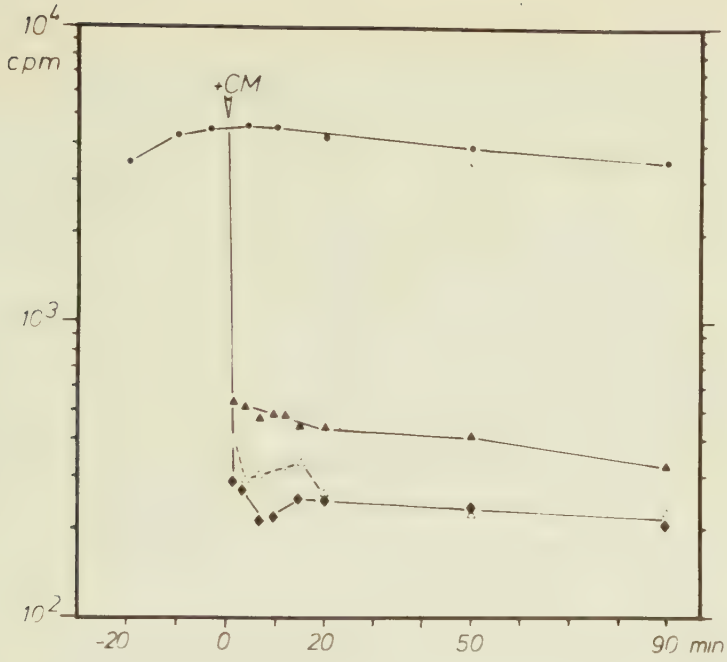


Abb. 1 Chloramphenicolhemmung des ^{3}H-Leu-Einbaus beim Stamm T4/2: ● 0 µg, ▲ 20 µg, △ 50 µg, ◆ 150 µg CM/ml.

Da die höchste CM-Konzentration die beste Hemmung zeigt (1% Restaktivität), werden für alle Versuche 150 µg/ml CM eingesetzt. Die Proteinsynthese ist durch diese Konzentration von CM sofort und vollständig hemmbar.

Einbau von ^{3}H-Urd in RNS:

Zur Bestimmung der RNS-Synthese kann markiertes Urd verwendet werden, das in der DNS nicht vorkommt. Aufgrund des gemeinsamen Stoffwechselweges von Urd und Thd könnte es aber sein, daß ein Teil des radioaktiven Uridins in

der Zelle zu Thymidin umgebaut wird und somit die Bestimmung der RNS-Syntheserate verfälscht (Kornberg 1974). Um diese Unsicherheit auszuschließen, habe ich untersucht, welcher Anteil der durch ^{3}H-Urd-Einbau gebundenen Radioaktivität in einer Pulsprobe alkalistabil ist, und als die Differenz den in Lösung gegangene Anteil errechnet: nach NaOH-Hydrolyse bleibt nur die in DNS gebundene ^{3}H-Aktivität TCA-fällbar und somit meßbar. RNS ist im Gegensatz zu DNS nämlich alkali-instabil.
Nach NaOH-Behandlung (1 M, 2 Std. in 60°) konnten nur noch 2% der ^{3}H-counts (ca. 2000 cpm) gemessen werden. D.h. daß nahezu alles ^{3}H-Urd in RNS eingebaut wird. Die kurze Zeit von 2 min spielt dabei sicher eine große Rolle.

c) Vergleich der Einbauraten bei 30° und 43° (Abb. 2 - 11, Tab. 2)

Betrachtet man die Kurven, die mit den Mutanten aufgestellt wurden, so fällt zunächst auf, daß bei 30° die Syntheseraten im allgemeinen zunehmen, obwohl doch die Raten pro Einzelzelle gleichbleiben sollten. Dies liegt daran, daß sich die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase befinden (Tab. 2, Zeile 1) und dadurch eine immer größere Zahl von ihnen an den Syntheseprozessen teilnimmt. In diesem Sinn muß auch das Abflachen oder gar Absinken der Raten gegen Ende des Versuches verstanden werden: Es laufen durchaus noch beachtliche Syntheseaktivitäten pro Zelle. Die Zelldichte ist aber schon so hoch, daß ein Teil der Zellen aufhört sich zu teilen und dadurch auch die Makromolekülsynthesen ein-

stellt. Wegen des geringen Einbaus von Radioaktivität pro Zelle muß die Zelldichte aber so hoch wie möglich sein, um zuverlässige Zählergebnisse zu erhalten. Weiter fällt ganz allgemein auf, daß bei fast allen gemessenen Kurven die 43°-Werte bis zweimal über den 30°-Werten liegen. Dies dürfte in der höheren Reaktionsgeschwindigkeit bei43° begründet sein. Diese Erhöhung der Syntheseraten wird aber besonders bei der DNS-Synthese häufig durch die T.-Inaktivierung überkompensiert und ist deswegen nicht immer deutlich (siehe Abb. 2 - 11, DNS-Synthese bei 42° kurz nach shift).

Beim dna$^+$-WT T4/2 liegen RNS- und Proteinsynthese bei 43° im Versuchszeitraum über den 30°-Werten (Abb. 2 und Tab. 2); die DNS-Synthese liegt wenig darunter. Da aber die Kultur auch bei 30° kein Ansteigen der DNS-Synthese zeigt, sich also am Ende der logarithmischen Wachstumsphase befindet, kann dies daran liegen, daß bei 43° die stationäre Wachstumsphase schon bei geringerer Zellzahl erreicht wird; oder aber die DNS-Synthese ist bei 43° ein wenig gestört.

Bei der dnaA-Mutante TB37 sinkt die Proteinsynthese bei 43° nicht unter die 30°-Werte (Abb. 3); Bagdasarian (et al. 1972) beschrieb, daß auch die RNS-Synthese bei 43° nicht inaktiviert wird. Der Verlauf der DNS-Synthese ist so wie er für eine Initiationsmutante erwartet werden kann: begonnene Replikationsrunden laufen zuende, neue werden nicht gestartet. Da die Zellen nicht synchronisiert sind, sind die Replikationsorte der Chromosomen zum Zeitpunkt des T.-shifts statistisch zwischen Replikationsorigin und Terminus verteilt; Nach ca. 40 min findet kaum mehr Replikation statt: alle Replikationsrunden sind am Terminus angelangt.

Ein ähnliches Verhalten bei der DNS-Synthese zeigen auch die Mutanten ts7, ts40, ts66 und ts87 mit Halbierungszeiten zwischen 12 und 22 min (Abb. 4 - 11, Tab. 2); bei ihnen wird die maximale (90%) Inaktivierung nach 30 - 90 min erreicht. Die RNS-Synthese wird bei allen relativ stark betroffen, die Proteinsynthese weniger (außer ts40 und ts87). Die Mutante ts87 zeigt eine sofortige Inaktivierung der Proteinsynthese und scheint ein Proteinschellabschalter zu sein, obwohl sie in den Vorversuchen schon auf ihr Proteinsyntheseverhalten geprüft worden war (Abb. 10). Die DNS-Syntheserate der Mutante ts 13 wird sehr schnell bis zum Minimum inaktiviert, ohne daß RNS- und Proteinsynthese stark betroffen sind (Abb. 5). Der Stamm ts77 wird zunächst ähnlich schnell inaktiviert, erreicht aber erst mit 30 min sein Minimum (Abb. 8). RNS- und Proteinsynthese bleiben intakt. Sehr langsam werden die Mutanten ts80 (Abb. 9) und ts107 (Abb. 11) in ihrer DNS-Synthese inaktiviert. Bei der Mutante ts80 ist die Proteinsynthese stark betroffen, bei der Mutante ts107 die RNS-Synthese. Bei der letztgenannten Mutante ist die Inaktivierung der DNS-Synthese nach T.-shift auch stark verzögert. Die DNS-Inaktivierung aller ts-Mutanten ist sehr stark (11% Restsynthese und kleiner). Die DNS-Synthese der Mutanten ts40, ts66, ts80, ts87 und ts107 wird nach 150 min noch weiter inaktiviert. Zellteilungen können noch die Stämme T4/2, TB37, ts7, ts40, ts66, ts87 und ts107 durchführen; die LKZ der Mutante ts80 wird durch 43° stark inaktiviert (Tab. 2, Zeile 1 und 2).

Die RNS- und Proteinsynthese bei 43° bleibt also nur bei den Stämmen T4/2, TB37, ts13 und ts77 intakt, bei allen anderen Mutanten werden sie mehr oder weniger inaktiviert. Die Mutanten ts13 und ts77 scheinen DNS-Syntheseabschalter zu sein.

	T4/2	TB37	ts7	ts13	ts40	ts66	ts77	ts80	ts87	ts107
LKZ-Vermehrung bei 30° (Faktor)	3x	3,7x	4x	2,7x	2,3x	3,4x	2,3x	7,5x	4x	2,2x
" " 43° (")	3x	1,6x	2,3x	0,8x	1,2x	1,7x	1x	0,01x	1,6x	1,7x
DNS-Syntheserate 43°										
Minimum gegenüber 30°	55%	6%	10%	4%	4%	11%	8%	0,7%	4%	9%
Halbierungszeit (min)	-	13'	13'	2'	12'	20'	2'	45'	22'	30'?
90% d. Inaktivierung bei min	-	40'	30'	4'	90'	80'	20'	100'	90'	70'
absolutes Minimum bei min	-	100'	40'	8'	160'	170'	80'	170'	170'	180'
RNS-Syntheserate 43°										
Minimum gegenüber 30°	-+		10%	-+	35%	10%	-+			35%
Halbierungszeit (min)	-+		60'	-+	-	25'	-+			15'
Proteinsyntheserate 43°										
Minimum gegenüber 30°	-	-	35%	40%	55%	40%	-	9%	20%	70%
Halbierungszeit (min)	-	-	80'	90'	80'	130'	-	50'	1'	80'

+ bei 42° gemessen, - trifft nicht zu, leere Felder nicht gemessen

Tabelle 2: Vergleich der Einbauraten bei 30° und 43°. Siehe auch Abb. 2 - 11.

d) DNS-Synthese in Abwesenheit von Proteinsynthese.
Vergleich mit den 43°-Kurven (Abb. 2 - 11, Tab. 3)

In Gegenwart von CM findet in den Zellen nur noch eine minimale Restproteinsynthese statt, die bei allen Stämmen 10 - 20 min nach der Hemmstoffzugabe nahe dem technisch möglichen Meßhintergrund liegt (Tab. 3, 4. Zeile). Durch das Abschalten der Proteinsynthese wird die Initiation der DNS-Synthese bei E.coli blockiert (Gross 1972), wodurch ein Vergleich mit temperatursensiblen Initiationsmutanten möglich sein sollte.

Tatsächlich sind auch die Abschaltkinetiken der Salmonella-Mutante TB37 (dnaA) mit CM bei 30° und ohne CM bei 43° sehr ähnlich (Abb. 3a). Ebenso verhalten sich auch die Mutanten ts66, ts80 und ts87,weniger ausgeprägt ts40 (Abb. 6, 7, 9, 10), was ebenso wie die Langsamkeit der Abschaltung auf einen Initiationsdefekt hinweist. Dies ist besonders bei der Mutante ts87 nicht überraschend, da sowohl CM wie die T. von 43° an der Proteinsynthese angreifen (Abb. 10c). Erstaunlich ist aber, daß die DNS-Synthese der Mutanten ts7, ts113 und ts107 ebenso wie des Wildtyps T4/2 durch CM nicht inaktiviert wird; und das, obwohl die DNS-Synthese der anderen ts-Mutanten (nur ts77 wurde nicht geprüft) bei 30° CM-sensibel ist (Tab. 3, 3. Zeile). Dies kann verschiedene Ursachen haben, die später diskutiert werden.

Bei 43° wird die DNS-Synthese aller Mutanten außer ts7 und ts77 stark inaktiviert, bei den Mutanten TB37, ts113, ts40, ts66 und ts80 aber nur kurze Zeit.Danach nimmt die DNS-Synthese nicht weiter ab (Kurven nicht gezeigt). Diese Inaktivierung könnte ein unspezifischer

Effekt von CM sein (Messer 1972). CM vermindert bei 30° auch die LKZ der Mutanten ts66 und ts87, während sich die Mutanten ts7, ts113 und ts80 sogar noch weiter teilen (Tab. 3, Zeilen 1 und 2). Dabei tritt die LKZ-Inaktivierung durch CM und 43° bei bestimmten Mutanten nicht gekoppelt auf und ist auch nicht korreliert mit der Inaktivierung der DNS-Synthese durch CM.

CM wirkt also auf die Zellen in zweierlei Weise; einmal auf die DNS-Synthese und einmal auf die LKZ. Beide Wirkungen sind nicht gekoppelt. Sie sind außer in der Wirkung auf die Initiation der DNS-Synthese auch unabhängig von der Wirkung der nichtpermissiven T. (siehe z.B. ts40 und ts80 in Abb. 6a und 9a sowie Tab. 3).

Tabelle 3:

	T4/2	TB37	ts7	ts113	ts40
LKZ-Vermehrung 43° Faktor	3x	1,6x	2,3x	0,8x	1,2x
LKZ-Vermehrung 30° CM "	0,8x	0,8x	1,5x	1,2x	1,1x
DNS-Endwert gegenüber 30°	55%	9%	90%	110%	45%
Protein: cpm 10' nach CM-Zugabe	190	200	160	140	170

	ts66	ts77	ts80	ts87	ts107
LKZ-Vermehrung 43° Faktor	1,7x	1,0x	0,01x	1,6x	1,7x
LKZ-Vermehrung 30° CM "	0,4x	1,0x	2,3x	0,6x	0,9x
DNS-Endwert gegenüber 30°	30%		6%	35%	85%
Protein: cpm 10' nach CM-Zugabe	220	220	210	200	160

e) Rückshiftexperimente mit und ohne CM:

Werden die Zellen nach T.-Abschaltung der DNS-Synthese (60 - 70 min bei 43°) wieder in die permissive T. gebracht, so läßt sich aus der Charakteristik des Verlaufs der DNS-Synthese einiges über die Umkehrbarkeit der T.-Inaktivierung aussagen. Bei fast allen Mutanten wird nach einiger Zeit (ca. 90 min) die DNS-Syntheserate der 30°-Kontrolle mit bezw. ohne CM allmählich wieder erreicht (Abb. 12 - 21, Tab. 4). Ausnahmen sind nur die Mutanten ts40 und ts80, bei denen sowohl die DNS- wie die Proteinsynthese geschädigt bleiben (Tab. 4, Zeile 4).

Wird gleichzeitig mit dem Rückshift die Proteinsynthese unterbunden, kann nur bei solchen Mutanten die DNS-Syntheserate wieder reaktiviert werden, deren temperatursensible Enzyme durch die nicht-permissive T. reversibel inaktiviert (denaturiert) werden: Neue aktive Enzyme können nicht gebildet werden. Ein starker Anstieg der DNS-Syntheserate nach Rückshift + CM bedeutet also Reversibilität (ts7, ts113, ts40, ts77, ts80 und ts107). Die temperatursensiblen Enzyme der Mutanten TB37, ts66 und ts87 scheinen durch 43° irreversibel geschädigt zu sein. Die leichte Reaktivierung bei den Mutanten TB37 und ts66 (Faktor 1,7, Tab. 4) könnte dadurch zu erklären sein, daß die Hemmwirkung von CM geringer als die der nicht-permissiven T. ist. Bei 30° stellt sich dann die in Gegenwart von CM mögliche, evtl. translationsunabhängige "Nullwert"-Replikation ein. Ein kleiner Teil der Enzyme könnte evtl. reversibel denaturiert sein.

Da CM auf die Zellen bei 43° unspezifisch inaktivierend zu wirken scheint (LKZ und DNS-Synthese, siehe Abschnitt d), wurde CM bei den ts-Mutanten gleichzeitig mit dem Rückshift zugegeben, was wegen der schnellen Wirkung von CM möglich ist (siehe Tab. 1 und Abb.1). Ein Teil der durch 43° + CM entstandenen Inaktivierung der DNS-Synthese beim Stamm T4/2 (Abb. 12) kann auch durch Rückshift nicht mehr rückgängig gemacht werden (siehe auch ts40 und ts80 ohne CM, Abb. 16 und 19).

Die Geschwindigkeit der Reaktivierung der DNS-Synthese läßt Überlegungen über den Mechanismus des Prozesses zu: die temperaturbedingte Konformationsänderung eines Enzyms, das an der Elongation beteiligt ist, kann sehr schnell erfolgen, wie bei der Mutante ts13, die eine gleichstarke, sehr schnelle Reaktivierung bei Rückshift mit und ohne CM zeigt, gefolgt von einer langsameren, die auf Protein-Neusynthese zurückzuführen ist (Abb. 14), da sie ohne CM nicht erfolgt. Alle anderen Mutanten zeigen eine mehr oder weniger langsame Reaktivierung mit und ohne CM, wie man sie für regulierte Neuinitiationen komplizierter Proteinkomplexe erwarten könnte. Aber auch die Beteiligung eines sekundären Prozesses ist denkbar, wie z.B. bei der Mutante ts87 (Abb. 20): obwohl die Proteinsynthese mit Rückshift zu 60% sofort reaktiviert wird, folgt die DNS-Synthese nur langsam. Dies ist eine Bestätigung dafür, daß bei dieser Mutante primär die Proteinsynthese temperatursensibel ist. Umgekehrt reagiert bei der Mutante ts13 die DNS-Synthese schnell und die Proteinsynthese langsam auf T.-Änderung (bei ts7 weniger stark ausgeprägt).

Die Rückshiftversuche bestätigen eindeutig, daß bei der Mutante ts13 die DNS-Synthese und bei der Mutante ts87 die Proteinsynthese temperatursensibel sind.

Ohne Protein-Neusynthese ist die DNS-Synthese der Mutanten ts7, ts13, ts40, ts77, ts80 und ts107 reaktivierbar, die temperatursensiblen Enzyme sind also reversibel inaktiviert (Tab. 4). Die DNS-Synthese der Mutanten TB37 und ts66 bleibt irreversibel geschädigt, für die Mutante ts87 ist der Grund der DNS-Inaktivierung auch vor Rückshift schon mangelnde Proteinsynthese, sodaß über die Reversibilität des betroffenen Enzyms keine Aussage gemacht werden kann. Die durchweg längeren Verdopplungszeiten der Proteinsyntheseraten (außer ts87) und ihre geringeren Reaktivierungsraten gegenüber der DNS-Synthese (Tab. 4) sind ein weiterer Hinweis darauf, daß die DNS-Synthese aller Mutanten außer ts87 durch die Temperatur stärker betroffen ist als die Proteinsynthese.

Tabelle 4: Rückshiftexperimente mit und ohne CM. Siehe Abb. 12 - 21.

	T4/2	TB37	ts7	ts13	ts40	ts66	ts77	ts80	ts87	ts107
Rückshift ohne CM: DNS-Synthese										
Minimum gegenüber 43°		50%	-	-	55%	-	70%	50%	-	50%
Verdopplungszeit (min)		8'	2'	1'	6'	27'	12'	15'	40'	15'
Maximum über Minimum: Faktor		23x	9x	20x	8x	5x	13x	3x	8x	15x
erreicht die 30°-Kontrolle		+	+	+	50%	+	+	25%	+	+
Rückshift ohne CM: Proteinsynth.										
Verdopplungszeit (min)		-	55'	85'	-	60'		-	1'	110'
Maximum über Minimum: Faktor		1,4x	2,2x	2,3x	1,5x	2,5x		1x	4,1x	2x
erreicht die 30°-Kontrolle		85%	+	+	45%	85%		30%	+	+
Rückshift mit CM: DNS-Synthese										
Minimum gegenüber 43°	(75%)	30%	80%	-	40%	50%	70%	35%	-	50%
Verdopplungszeit (min)	(10')	-	10'	1'	8'	-	10'	12'	80'	12'
Maximum über Minimum: Faktor	(2x)	1,7x	5x	3x	9x	1,7x	5x	2,5x	-	6x
erreicht die 30°-CM-Kontrolle		+	+	+	+	+		+	+	+

f) Doppelshiftexperiment:

Wird die Rückshiftkultur nach kurzer Zeit in der permissiven T. (15 min) nach einem zweiten shift noch einmal der nicht-permissiven T. ausgesetzt, so ergibt sich für die verschiedenen Mutanten ein unterschiedliches Bild: teilweise tritt die Temperaturinaktivierung sofort ein, wie man es für Elongationsmutanten erwarten kann, teilweise verzögert, was durch den synchronisierenden Effekt dieses Versuchsablaufes auf alle Defekte in der Initiation der DNS-Synthese erklärbar ist (Abb. 12-21, Tab. 5).

Bei der Mutante ts13 (Abb. 15a, Tab. 5) sieht die Inaktivierung durch den 2. shift derjenigen durch den 1. shift sehr ähnlich, sowohl was den Verlauf der Kinetik wie die Effizienz der Inaktivierung anbelangt: Die Inaktivierung setzt sofort ein und ist sehr schnell. Bei den Mutanten ts7 und ts40 (Abb. 14a und 16a) tritt beim zweiten shift eine Verzögerung der Inaktivierung ein, die vielleicht einer Neuinitiation von Replikationsrunden zugeschrieben werden kann. Bei der Mutante ts7 (Abb. 14a) wird diese DNS-Replikation sehr schnell durch starke Inaktivierung überlagert; bei ts40 ist sie stärker ausgeprägt (Abb. 16a). Die Mutante ts66 zeigt beim 2. shift ebenfalls eine sehr starke DNS-Synthesereaktivierung, die durch 43° in 90 min aber nicht mehr auf das durch den 1. shift erreichte Minimum herabgedrückt werden kann (Abb. 17). Bei allen untersuchten Mutanten reaktiviert die kurze Zeit in der permissiven T. eine DNS-Synthesekapazität, die bei der Mutante ts66 stabil bleibt, bei den anderen Mutanten jedoch schnell wieder aufgebraucht wird. Der Verlauf des zweiten shifts legt für die Mutante ts13 einen temperatursensiblen Elongationsschritt nahe, da trotz starker Reaktivierung die In-

aktivierung sofort wieder aufgenommen wird. Für die Mutanten ts7, ts40 und ts66 kommt wegen der Verzögerung beim zweiten shift eine Temperatursensibilität in der Initiation in Frage. Doch ist dies im Zusammenhang mit anderen Ergebnissen noch zu diskutieren.

Tabelle 5: Doppelshiftexperiment:

	ts7	ts13	ts40	ts66
43° DNS-Synthese				
Halbierungszeit (min)	73'	2'	12'	20'
Minimum gegenüber 30°	10%	4%	4%	11%
Verzögerung der Inaktivierung (min)	-	-	-	-
2. shift DNS-Synthese				
Halbierungszeit (min)	15'	5'	25'	-
Minimum gegenüber 30°	11%	6%	5%	55%
Verzögerung der Inaktivierung (min)	10'	-	15'	20'
Maximum über 43°-Kontrolle: Faktor	3,7x	6x	2,2x	1,9x

g) Replikation von Phagen-DNS:

Es war das vordringliche Ziel der Isolierung von ts-Mutanten in Sal.tm., die Abhängigkeit bezw. Unabhängigkeit der DNS-Replikation des Phagen P22 von Wirtsgenprodukten zu untersuchen. Dazu wurden Pulskinetiken der DNS-Synthese nach P22-Infektion der verschiedenen Mutanten bei der permissiven und nicht-permissiven T. durchgeführt. In Vorversuchen war durch Phagenvermehrung in Flüssiglysaten und durch Plaquebildung auf

den einzelnen Mutanten sichergestellt worden, daß der Phage P22 sich in allen untersuchten Mutanten bei 30° vermehren kann. Die Messung der DNS-Synthese ist bei der T. von 42° die einzige Möglichkeit, die Vermehrung des Phagen zu untersuchen, da ein später temperatursensibler Schritt in der Reifung (assembly) des Phagen bei dieser T. die biologische Bestimmung der Zahl gebildeter reifer Phagen unmöglich macht (Israel 1967).

Die DNS-Synthese nach Infektion der dnaA-Mutante TB37 hat Herr Backhaus in unserem Labor (Backhaus und Schmieger, in Vorbereitung) gemessen: Replikation von Phagen-DNS findet statt, wenn die Wirtssynthese abgeschaltet ist. Die Replikation der Phagen-DNS ist also von der dnaA-Funktion des Wirtes nicht abhängig. Frau Schanda-Mulfinger, ebenfalls in unserem Labor, (Schanda-Mulfinger und Schmieger, in Vorbereitung) konnte zeigen, daß nach Induktion in E.coli-dna-Mutanten der Phage P22 von dnaA, dnaB und dnaC unabhängig ist, abhängig dagegen von dnaE, dnaG, dnaZ und lig.

Eine große Schwierigkeit ist, daß sich zwar der Phage P22 in der Mutante TB37 und dem dazugehörigen dna^+-Stamm sehr gut bei 43° replizieren kann; aber im Stamm T4/2, den ich als Ausgangsstamm für die ts-Mutanten verwendet habe, ist nach der 6. Minute anstelle des zu erwartenden Anstiegs der phageneigenen DNS-Synthese ein starker Abfall auf 35% zu bemerken (Daten nicht gezeigt). Deshalb werden alle Phageninfektionen bei 42° gemessen, wo die DNS-Synthese normal verläuft (Abb. 23). Es wird mit der Klarplaquemutante H5 bei einer moi = 5 bis 10 infiziert. Da diese Mutante nicht lysogenisieren kann, führt jede

Tabelle 6: Phagenreplikation:

	T4/2	ts7	ts13	ts40	ts66	ts77	ts107
30° DNS-Synthese infiziert							
% Einbau 5 min nach Infektion	80%	95%	80%	90%	95%	85%	70%
Lysebeginn (min)	60'	70'	70'	85'	?	60'	90'
moi	11	5	5	4	7	4	10
burst size	150	50	85	100	25	50	30
42° DNS-Synthese infiziert							
%Einbau 5 min nach Infektion	70%	95%	100%	80%	35%	65%	85%
danach Anstieg	+	-	++	±	+	-	+
Lyse nach min	60'	-	60'	70'	?	-	90'
42° DNS-Synthese nicht infiziert							
% Einbau von 30° zum Infektionszeitpunkt	110%	58%	13%	90%	140%	11%	45%

- trifft nicht zu, leere Felder nicht gemessen

Infektion zu DNS-Replikation. Die Pulsdauer beträgt bei diesen Versuchen 5 min. Kurzzeitige Änderungen der Syntheserate, wie sie nach Phageninfektion beobachtet werden können (Backhaus und Schmieger, in Vorbereitung) werden durch die lange Pulsdauer verwischt.

Ein Vergleich von moi und burst size bei diesen Versuchen zeigt, daß sich der Phage bei 30° in allen getesteten Mutanten vermehrt, wenn auch unterschiedlich (Tab. 6). Auch die Pulskinetiken zeigen, daß die Phagen-DNS in allen diesen Mutanten bei 30° repliziert wird: zuerst sinkt für ca. 10 min die Einbaurate wegen der phagencodierten Abschaltung der Wirts-DNS-Synthese und dann wegen der auch in c2-Mutanten noch intakten c1-Genfunktion etwas ab. Dann steigt sie aber bis 10 - 20% über den nichtinfizierten 30°-Kontrollwert an und sinkt nach der 60. Minute wegen der Lyse der Zellen stark ab. Diese Lyse tritt bei den Mutanten ts40 und ts107 verzögert ein (sowohl bei 30° wie 43°). (Abb. 23 - 29).

Bei 42° werden die log-Kulturen der ts-Mutanten nach 60 min Inkubation (0 min und 10 min bei ts13 wegen der schnellen Abschaltung) mit Phagen infiziert. In den Mutanten ts13 (beide Infektionszeiten)[+] und ts107 folgt auf Abschaltung 10 min nach Infektion ein starker Anstieg der DNS-Synthese (Abb. 25, 28). Bei der Mutante ts40 ist dieser Anstieg sehr schwach (Abb. 26); bei den Mutanten ts7 und ts77 fällt die DNS-Synthese danach weiter ab, nimmt aber bei ts77 nach 25 min wieder zu und erreicht den nichtinfizierten 43°-Kontrollwert (Abb. 24, 27). Allerdings ist nur die DNS-Synthese der Mutanten ts13 und ts77 zum Zeitpunkt der Infektion genügend inaktiviert, um aussagekräftig zu sein.

[+] Abb. 25 zeigt nur das 0′-Experiment

Überhaupt nicht temperatursensibel bei 42° ist die Mutante ts66, weswegen die Kurven nicht gezeigt werden. Schwach temperatursensibel bei 42° sind die Mutanten ts7, ts40 und ts107. Trotzdem wird die Phagen-DNS in der Mutante ts7 nicht repliziert; die Phagen-DNS-Synthese scheint demnach also sensibler auf das betroffene, aber nur schwach inaktivierte Genprodukt ts7 zu reagieren, als die Wirts-DNS-Synthese. Über die Abhängigkeit des Phagen von den temperatursensiblen Genprodukten der Mutanten ts40, ts66 und ts107 kann keine Aussage gemacht werden.

Abhängig ist der Phage P22 von der Wirts-DNS-Synthese in den Mutanten ts7 und ts77, unabhängig bei beiden Infektionszeiten vom temperatursensiblen Genprodukt der Mutante ts13.

h) DNS-Abbau unter nicht-permissiven Bedingungen:

Bei den E.coli dnaB-, dnaD-, dnaG- und lig-Mutanten, sowie bei DNS-Synthesestopp durch physikalische und chemische Agentien findet DNS-Abbau statt. Nicht abgebaut wird dagegen die DNS in Initiationsmutanten (Gross 1972). Um bei den hier beschriebenen ts-Mutanten den DNS-Abbau zu messen, wurden mit ^{3}H-Thd markierte Kulturen dieser Mutanten der nicht-permissiven T. ausgesetzt und der Gehalt an TCA-fällbaren ^{3}H-Impulsen gemessen. Bei den Mutanten T4/2, ts13 und ts40 war er fast identisch mit der 30°-Kontrolle (Abb. 22), bei der Mutante ts77 nahm er ganz wenig ab (ca. 18%). Bei der als Kontrolle mitgemessenen dnaE-Mutante von E.coli nahm er ebenfalls nur um 18% in 4 Std. ab. Da aber die DNS von dnaE-Mutanten bei 43° im Gegensatz zu dnaB fast stabil ist (Schuster et al. 1973), ist wohl auch die DNS

der Mutante ts77 ebenso wie die der Mutanten ts13 und ts40 als stabil zu bezeichnen. Auch die LKZ, die bei DNS-Abbau drastisch abnehmen müßte, wird bei der nicht-permissiven T. in diesen Mutanten nicht verringert (siehe Tab. 2).

B) Wachstumskinetiken und Morphologie

Die Zellteilung ist bei E.coli nach Versuchen von Slater und Schaechter (1974) und Louarn et al. (1977) mit der Termination der DNS-Replikation gekoppelt. Deshalb führt Abbruch der DNS-Synthese in dna_{ts}-Mutanten sehr oft dazu, daß sich die Mutantenzellen bei nicht-permissiver T. nicht weiter teilen (Hirota et al. 1970). Bei allen Initiationsmutanten (dnaA, dnaC, dnaI, dnaH und dnaP) kommen die Zellteilungen zusammen mit der DNS-Synthese einige Zeit nach T.-shift fast zum Stillstand, teilen sich danach allerdings noch mit stark verminderter Rate weiter (Gross 1972). Das dnaH-Genprodukt scheint direkt an der Zellteilung beteiligt zu sein (Filip et al. 1974).

Die Elongationsmutanten dnaE, dnaG und dnaZ teilen sich nach T.-shift fast nicht weiter, jedenfalls sehr viel weniger als Initiationsmutanten; nur dnaB-Mutanten führen fast unvermindert Zellteilungen durch (Gross 1972). Meist werden die Zellen jedoch schon nach kurzer Zeit stark abgetötet, was sich in einer Verminderung der LKZ bemerkbar macht, besonders stark

bei dnaB-, dnaZ- und lig-Mutanten (Gross 1972, Chu et al. 1977, Horiuchi et al. 1975). Manchmal kann die Abtötung bei der nicht-permissiven T. durch hohe Salzkonzentrationen oder Zuckerkonzentrationen supprimiert werden. Gleichzeitig wird dabei auch der Effekt auf die DNS-Synthese unterdrückt (bei dnaB: Gross 1972; bei dnaZ: Chu et al. 1977).

Aufgrund der Hemmung der Zellteilung in dna_{ts}-Mutanten bilden die Zellen Schlangen, da ja RNS- und Proteinsynthese weiterlaufen und sich dadurch die Zellmasse dauernd vergrößert (Ahmed u. Rowbury 1974). Auch bei der Sal.tm. dnaA-Mutante wurde dieser Effekt beobachtet (Bagdasarian et al. 1972). Bei allen ts-Mutanten habe ich deshalb parallel zu den Pulsmarkierungen die LKZ-Kinetiken in TCG-Medium gemessen.

1. Lebendkeimzahlen in Minimalmedium(TCG-Medium): (siehe Abb. 29)

T4/2: 30°- und 43°-Kulturen wachsen etwa gleichschnell.

TB37: Die 43°-Kultur vermehrt sich in 180' um 150%.

ts7: Die LKZ dieser Mutante sinkt nach einer kurzen Wachstumsphase bei 43° in 180' auf 40%.

ts13: Nach einer kurzen Teilungsphase wächst die Kultur bei 43° nicht weiter, sondern wird um etwa 20% inaktiviert.

ts40: etwa 20% der Zellen teilen sich nach T.-shift noch einmal; die LKZ bleibt dann erhalten.

ts66: Hier teilen sich 70% der Zellen noch einmal und wachsen dann nicht weiter, bleiben aber lebensfähig.

ts77: Ähnlich wie bei der Mutante ts13 findet zunächst Wachstum und nachfolgende geringfügige Inaktivierung statt.

ts80: Die LKZ dieser Mutante nimmt bei 43° sehr schnell ab: auf 8% des 0'-Wertes in 180'.

ts87: Der Titer dieser Mutante nimmt bei 43° um 30% zu; die Zellen werden dann kaum inaktiviert.

ts107: 70 - 100% der Zellen teilen sich noch einmal und werden dann langsam inaktiviert.

Nur die Mutante ts80 wird also bei der nicht-permissiven T. stark in ihrer Koloniebildungsfähigkeit beeinträchtigt. Die Mutanten ts7, ts13, ts77 und ts107 teilen sich zunächst noch mehr oder weniger und werden dann leicht inaktiviert (ts7 am stärksten). Die Mutanten TB37, ts40, ts66 und ts87 vermehren nach T.-shift ihre Zellzahl noch um 20 - 70% und können dann die Lebensfähigkeit aller Zellen bei der höheren T. aufrechterhalten. Durch den direkten oder indirekten Stopp der DNS-Synthese wird also bei allen Mutanten die Zellteilung früher oder später gehemmt, obwohl zumindest die Proteinsynthese bei allen Mutanten (außer bei ts80 und ts87) fast unbeeinträchtigt weiterläuft.

Die Inaktivierung der Lebensfähigkeit ist nur bei der Mutante ts80 sehr stark, weniger ausgeprägt bei ts7. Die Mutanten ts40, ts66 und ts87 ähneln also in ihrem Verhalten den Initiationsmutanten von E.coli ebenso wie der Sal.tm.-Mutante TB37 (Abb. 30).

2. Zelltiter und Morphologie in Vollmedium (NB):

Durch die LKZ-Bestimmung läßt sich nur die Anzahl lebender Zellen bestimmen, die Kolonien bilden können: die Zunahme der LKZ zeigt die Zahl der Zellen an, deren Tochterzellen ein intaktes Chromosom erhalten haben. Es kann aber auch sein, daß bei dna_{ts}-Mutanten die Zellteilung von der Chromsomenteilung entkoppelt ist, also tote Zellen ohne Chromosomen entstehen (siehe z.B. Shannon und Rowbury 1975). Deshalb wurde bei den besonders gut temperatursensiblen Mutanten ts13 und ts77 die durch Plattierung bestimmte LKZ mit der mikroskopischen Zählung verglichen, um den Anteil toter Zellen zu erfassen und die Morphologie der Zellen während der Inkubation in 43° zu verfolgen. Das Verhältnis der mikroskopischen Zählung zur LKZ (M/L) liefert ein Maß für den Anteil toter Zellen in der Kultur. Da in Vollmedium die T.-Inaktivierung von dna_{ts}-Mutanten stärker ist als in Minimalmedium (Carl 1970), wurden diese Untersuchungen in NB durchgeführt.

Zur Kontrolle wurden noch der WT T4/2 und die dnaA-Mutante TB37 dazugenommen (Abb. 30 und Tab.7).
WT T4/2: Die 30°- und 43°-Kulturen vermehren sich gleichschnell, sowohl bei mikroskopischer, wie bei biologischer Zählung. Die mikroskopische Zählung liefert 1,3 - 2,8 mal höhere Titer (systematischer Zählfehler oder konstanter Anteil an toten Zellen). Bei den 30°-Kulturen wird dieses Verhältnis auch von den 3 gemessenen Mutanten in etwa eingehalten, bei 43° weicht es mehr oder weniger ab.

Die Zellen des Stammes T4/2 sehen im Mikroskop gleichmäßig stäbchenförmig aus, viele sind in Teilung begriffen, aber unbeweglich. Bei 43° jedoch sind sie ungleichmäßig große Stäbchen, meist kürzer als bei 30°; manche Zellen bilden Schlangen. Diese Schlangen sehen allerdings septiert aus und zerfallen wohl nach einiger Zeit.

TB37: Die LKZ der 43°-Kultur bleibt gegenüber der 30°-Kultur in 4 Std. um den Faktor 18 zurück, obwohl sie sich noch um das 6-fache vermehrt. Der hohe Vermehrungsfaktor bei 43° ist wohl auf das Vollmedium und die dadurch bedingte größere Zahl von Chromosomen pro Zelle zurückzuführen, die auch nach Initiationsstopp noch weitere Zellteilungen ermöglichen, oder auf die größere Zahl von Replikationsgabeln pro Chromosom, die bei Termination jeweils noch ein Teilungssignal auslösen könnten. Die bei weitem geringere Zunahme des mikroskopisch bestimmten Titers auf weniger als das Doppelte zeigt, daß ein Teil der Zellen Schlangen bildet, die nur einmal gezählt werden, beim Pipettieren und Ausplattieren aber zerbrechen und mehrere Kolonien bilden können. Die Schlangen sind also bereits septiert. Das Zählungsverhältnis mikroskopischer zu biologischer Zählung (M/L) ist bei 30° wie bei 43° anfangs 9(8) und sinkt dann auf 2 (1,9) ab. Der hohe Anfangswert könnte auf einen hohen Anteil nicht aktiver oder toter Zellen zurückzuführen sein, da diese Kultur mit viel inaktiver Kühlraumkultur angeimpft und noch nicht genügend weit gewachsen war. Das Ver-

hältnis von 1,9 als Endwert der 43°-Kultur zeigt, daß sich keine oder nur wenig tote Zellen darin befinden: 2 ist auch der Kontrollwert bei 30° sowie bei dem Stamm T4/2 bei 30° und annähernd auch bei 43°.

Die bei 30° gewachsenen Zellen sehen im Mikroskop gleichmäßig stäbchenförmig aus und sind sehr beweglich. Bei 43° sind nach 4 Std. ca. 50% der Zellen lange, unbewegliche Schlangen (Bagdasarian et al. 1972).

Mut. ts13: Bei 43° bleibt der Kolonietiter hinter dem 30°-Titer um den Faktor 16 zurück, bei der mikroskopischen Zählung um den Faktor 6. Die LKZ nimmt bei 43° also viel weniger stark zu als die mikroskopisch sichtbaren Zellen. Das Zählverhältnis M/L ist bei 30° normal (0,8 - 2,3), bei 43° hingegen steigt es nach 180' (270') auf 4,5 (4,4); das durchschnittliche Zählverhältnis wird also um den Faktor 2 überschritten: etwa die Hälfte aller mikroskopisch sichtbaren Zellen sind nicht mehr lebensfähig. Die LKZ bei 43° steigt aber langsam an: lebende Zellen werden nicht inaktiviert.

Bei 30° sehen die Zellen im Mikroskop ähnlich aus wie die des WT T4/2: unbewegliche Stäbchen, die hier aber kürzer sind. Bei höherer Kulturdichte wird ein immer größerer Anteil der Zellen kleiner (Kurzstäbchen) und kugelig (stationäre Zellen?). Bei 43° aber treten schon nach 40' sehr viele solcher kleinen Kugelzellen auf, sowie neben den teilenden Kurz-

stäbchen dick aufgeschwollene, zitronenförmige Zellen, die bei längerer Inkubationszeit an Zahl zunehmen, stark lichtbrechend werden und unregelmäßig knospen. Diese abgespaltenen Knospen sind evtl. die toten Zellen. Schlangenbildung konnte ich bei dieser Mutante nicht beobachten (siehe auch Shannon und Rowbury 1975).

Mutante ts77: Bei dieser Mutante weicht das $30^{\circ}/43^{\circ}$-Zählverhältnis nach 270' noch stärker vom Normalwert ab: 28 bei LKZ-Bestimmung (bei 180' sogar 75) und 8 bei mikroskopischer Zählung. Das Verhältnis M/L ist bei 30° normal (1 - 2,7), bei 43° aber steigt es von 1,3 (0') bis auf 24 (180'), d.h. daß nur etwa 10% der Zellen leben, 90% der Zellen wurden durch 3-stündige Inkubation bei 43° abgetötet (Tab. 7).

Auch in NB findet nach T.-shift zu 43° zunächst noch leichte Zellvermehrung statt, gefolgt aber von Inaktivierung auf 40% in 3 Std. (Abb. 30). Danach nimmt der Zelltiter wieder zu. Der schwachen Zunahme der LKZ steht eine 60' lang nicht, dann nur wenig verminderte Zellteilungsaktivität gegenüber, die bei mikroskopischer Zählung sichtbar ist, also nur tote Tochterzellen liefert, vielleicht ähnlich der dnaC-Mutante bei Sal.tm. (Ahmed und Rowbury 1974).

Bei 30° sehen die Zellen dieser Mutante völlig unterschiedlich aus: kugelige Zellen, Kurzstäbchen, normale Stäbchen wie beim Stamm T4/2 und wenige größere, stark lichtbrechende Zellen; alle sind unbeweglich; einige Zellen neigen zur Schlangenbildung. Auch bei

43° treten noch nach 270' alle diese Typen auf, docn sind 30% der Zellen lange Schlangen, die teilweise septieren und stäbchenförmige Zellen abspalten. Evtl. sind dies die toten Zellen.

Bei dem dna$^+$-Stamm T4/2 und bei der dnaA-Mutante TB37 verlaufen DNS-Replikation und Zellteilung streng gekoppelt, das Verhältnis M/L bleibt ungefähr konstant. Das ist auch für die 30°-Kulturen der Mutanten ts13 und ts77 der Fall. Kommt bei der Mutante TB37 die DNS-Synthese zum Stillstand, teilen sich auch die Zellen nur noch kurze Zeit weiter: alle Zellen in der Kultur leben. Dagegen teilt sich die Mutante ts77 bei 43° auch bei Stillstand der DNS-Synthese nach einiger Zeit fast unvermindert weiter, was zur Produktion toter Zellen führt. Bei der Mutante ts13 ist dieser Effekt auch zu bemerken, doch ist er nicht so stark ausgeprägt. Jedoch ist bei der Mutante ts13 auch das Längenwachstum gestört (siehe auch Shannon und Rowbury 1975).

Tabelle 7: Zelltiter in Vollmedium (M/L):

Das Verhältnis der mikroskopischen Zählung zur Lebendkeimzahl.

min	T4/2		TB37		ts13		ts77	
	30°	43°	30°	43°	30°	43°	30°	43°
0'	0,7	1,3	9	8	0,8	1	1	1,3
40'	2,8	1,6	5	5	1,6	1,2	2	4
90'	2,2	1,6	3,4	4,4	2,3	2,1	2,3	14,4
180'	2	1,5	2	4,7	1,4	4,5	2,6	24
270'	1,5	1,3	2,3	1,9	1,6	4,4	2,7	8

C) Wechselwirkung mit anderen Replikons

1. Integrative Suppression

Die Genprodukte der Gene dnaA, dnaC, dnaH, dnaI und dnaP wirken hochspezifisch bei der Initiation am Replikationsorigin des Bakterienchromosoms von E.coli mit. Andere Replikons, wie Plasmide und Phagen, sind von diesen Genprodukten meist unabhängig und benützen für die Initiation eigene Genprodukte oder haben einen sehr viel einfacheren Initiationsapparat als das E.coli-Chromosom (Taketo 1976, Truitt und Walker 1974, Staudenbauer et al. 1978). Ist ein solches Replikon in das Bakterienchromosom integriert, so kann in bestimmten Fällen die Replikation des ganzen Chromosoms am fremden Replikationsorigin initiiert werden, wenn dies am eigenen nicht möglich ist, wie z.B. in den obengenannten Initiationsmutanten bei nicht-permissiver T.. Dieser Vorgang heißt integrative Suppression und ist bei allen dna-Initiationsmutanten von E.coli prinzipiell möglich (Yura, mündl. Mitteilung). Beschrieben wurde sie z.B. beim F-Faktor (Tresguerres et al. 1976) und beim Phagen P2 (Kuempel et al. 1977). Wirkt der Phage P22 oder der F-Faktor auf die ts-Mutanten von Sal.tm. integrativ supprimierend? Dies würde sich durch Unterdrückung der T.-Sensibilität der lysogenisierten Mutanten bezw. deren Hfr-Derivaten, mindestens aber durch Erhöhung der Rückmutationshäufigkeit zeigen.

Um dies zu prüfen, wurden die ts-Mutanten und der WT-Stamm T4/2 zunächst mit dem Phagen H1 lysogenisiert, die lysogenen und die dazugehörigen alysogenen Kontrollstämme über Einzelkolonien gereinigt, um den Anteil an spontanen ts^+-Rückmutanten in den Kulturen möglichst niedrig zu halten. Von je 3 Einzelkolonien wurden ÜK's gezogen und bei 43^o auf ihre T.-Sensibilität geprüft. Keine der Mutanten ts7, ts13,ts40, ts66, ts77 und ts107 waren als P22-Lysogene weniger temperatursensibel als die alysogenen Kontrollstämme. Bei den Mutanten ts7, ts13 und ts107 war die ts-Rückmutationshäufigkeit auch in lysogenem Zustand kleiner als 10^{-8} (keine Rückmutante unter 2×10^8 plattierten Zellen). Die Mutante ts40 wächst etwas bei43^o, aber keine Rückmutante war über dem Bakterienrasen zu sehen. Die Mutanten ts66 und ts77 haben eine spontane Rückmutationshäufigkeit von etwa 10^{-5}, die durch P22-Lysogenie nicht erhöht wird. Dasselbe Ergebnis erhielt ich mit Hfr-Derivaten von allen diesen ts-Mutanten (siehe Abschnitt D1).

Weder die Integration des Phagen P22, noch des F-Faktors kann also die ts-Mutanten integrativ supprimieren. Das könnte bedeuten, daß keine der untersuchten ts-Mutanten vom Typder Initiationsmutanten bei E.coli ist, oder daß die integrative Suppression in ts-Mutanten von Sal.tm. durch den verwendeten Hfr-Stamm oder durch P22 nicht möglich ist.

2. Induktion von integrierten P22-Phagen

Der Phage λ, der dem P22-Phagen in mancher Hinsicht ähnlich ist, wird, ist er in das Bakterienchromosom integriert, bei Störungen des DNS-Stoffwechsels z.B. durch UV-Bestrahlung (Gross 1972), durch Cyclo-Cytidin (Taketo 1976 b) oder bei dna-Mutanten durch kurzzeitigen T.-Schock (Schuster et al. 1973, Blanco und Pomes 1977) induziert; d.h. der Prophage tritt in den lytischen Cyclus ein und lysiert die Zelle unter Freisetzung reifer Phagen. Bei allen Prozessen, die den DNS-Stoffwechsel stören, scheint recA-Genprodukt vermehrt produziert zu werden, das den Phagenrepressor inaktiviert und dadurch den Prophagen induziert (Smith und Oishi 1978). Schuster et al. fanden 1973 λ-Induktion bei dnaB-, dnaE- und dnaG-Mutanten, Chu et al. 1977 bei dnaZ-Mutanten. Keine λ-Induktion wurde bei den Initiationsmutanten beschrieben. Eine Klassifikation neuer Mutanten sollte auf diese Weise leicht möglich sein. Wird bei den ts-Mutanten von Sal.tm. der Phage P22 in Analogie zu λ in E.coli induziert?

Um dies zu untersuchen, wurden log-Kulturen der lysogenen ts-Mutanten gezogen und nach 0, 10 und 30 min Inkubation in 43° 2 Std. in 30° zur Phagenentwicklung weitergeschüttelt. Nach Zugabe von Chloroform wurde der Phagentiter bestimmt. In der Tabelle aufgetragen ist der Quotient der 10 min- bezw. 30 min-Titer zum Nullwert ohne 43°-Inkubation (0 min). Es wurden jeweils 3 unabhängige Lysogene geprüft.

Tabelle 8: Phageninduktion durch Temperaturschock

	T4/2	ts7	ts13	ts40	ts66	ts77	ts107
10/0 min	0,1	0,5	0,8	0,4	2,3	1,3	1,2
	o,3	0,4	0,8	0,6	4	1,4	0,8
	2,5	0,4	0,9	0,3	2	1,4	0,3
30/0 min	0,1	15	30	0,2	1,6	0,7	1
	0,05	26	0,3	0,3	2	0,6	1,6
	0,5	46	0,3	0,2	1,1	0,6	0,5

Aufgetragen ist der Quotient $\frac{\text{Temperaturschock-behandelte Kultur}}{30^{\circ}\text{-Kontrollkultur}}$

mit 10 und 30 min 43°-Behandlung.

Die Anzahl spontan freigesetzter P22-Phagen in einer ÜK ist, verglichen mit T4/2(Hl) = 100%, bei den Mutanten ts7 und ts13 nur 1%, bei den Mutanten ts66 und ts107 nur 0,1% und bei den Mutanten ts40 und ts77 etwa 50 - 100%. Die hohe Phagenfreisetzung bei der Mutante ts7(Hl) nach 30 min Inkubation bei 43° entspricht der Anzahl freier Phagen in der 30°-Kultur des Stammes T4/2(Hl). Trotzdem läßt sich die vermehrte Freisetzung nach verlängerter 43°-Inkubation nicht übersehen: 30 - 115 mal mehr Phagen werden freigesetzt, wenn die lysogene Kultur ts7(Hl) 30 min statt 10' bei 43° inkubiert wird. Die vermehrte Freisetzung von P22 bei einem Isolat der Mutante ts13 kann ein nicht-reproduzierbares Einzelergebnis sein. Die Erhöhung des Quotienten bei der Mutante ts66 ist mit maximal 4 bei einem Wert zu schwach um aussagekräftig zu sein, da die Anzahl der gezählten Plaques eine statistische Absicherung nicht zuläßt.

Die Mutante ts7 zeigt also als einzige der geprüften Mutanten eine Induktion des Phagen P22 nach T.-Schock. Die anderen Mutanten waren in diesem Versuch nicht induzierbar.

D) Kartierungsversuche

Die vorhergegangenen Versuche der Kapitel A, B und C hatten alle die Phänotypische Charakterisierung der T.-Sensibilität zum Ziel. Sie lieferten Aussagen über die Inaktivierung der DNS-, RNS- und Proteinsynthese, über die Reversibilität des temperatursensiblen Proteins, über die Stabilität der DNS in der nicht-permissiven T.. Es wurde untersucht, ob der P22-Prophage in den ts-Mutanten durch T.-Schock induziert werden kann und ob sowohl er wie der integrierte F-Faktor integrative Suppression des ts-Phänotyps bewirken. Ferner wurde die LKZ, die Zellteilung und Zellform nach T.-shift untersucht. Dabei zeigte sich, daß einige der Mutanten temperatursensibel in der DNS-Synthese geworden sein könnten, ja daß die Mutanten ts13 und ts77 ziemlich sicher dna_{ts}-Mutanten sind.

Um die Mutationsorte nun auch genetisch näher zu charakterisieren und evtl. Analogien zu Genen bei E.coli herzustellen, wurden nun Kartierungsexperimente unternommen. Die Analogie zu E.coli herzustellen erscheint dabei gerechtfertigt, da das Sal.tm.-Chromosom mit nur wenigen Ausnahmen analoge Genorte mit gleicher Funktion der Genprodukte an gleicher Kartenposition bei E.coli aufweist (Sanderson und Hartmann 1978), wie schon in der Einleitung zu dieser Arbeit betont wurde. Auch war es möglich, den Genort dnaA in beiden Organismen an analoger Stelle zu kartieren.

Leider ist aber die Kartierung in Sal.tm. mit sehr viel größeren Schwierigkeiten verbunden, als in E.coli. Dies liegt hauptsächlich an der sehr geringen Effizienz der F-Duktion und des Chromosomentransfers (Sanderson et al. 1972). Außerdem sind wegen der hohen Rückmutationsraten zu ts^+ (T.-Resistenz) bei den meisten Stämmen direkte Selektionsmethoden für ts^+-Rekombinanten nicht durchführbar. Deswegen werden die verschiedenen im folgenden beschriebenen Versuche zur Lösung des Kartierungsproblems unternommen.

1. Bestimmung der Korekombinationshäufigkeiten:

Diesem Kartierungsversuch liegt die Idee zugrunde, mit Hilfe des Chromosomentransfers prototrophe Rekombinanten der ts-Mutanten mit verschiedenen rund um das Chromosom verteilten Auxotrophie-Markern zu isolieren. Als Spender dienen dabei die ts-Mutanten. In einem bestimmten Bereich des Chromosoms sollten dabei solche Rekombinanten auftreten, die gleichzeitig mit dem WT-Marker der ts-Mutante, der dem Auxotrophiemarker entspricht, den ts-Marker einrekombiniert haben. Dies deutet dann auf eine Nachbarschaft der beiden Genorte hin und somit auf die Kartenposition. Um diesen Versuch durchzuführen, müssen zunächst die ts-Mutanten zu Hfr-Stämmen gemacht werden.

a) Konstruktion eines geeigneten Hfr-Spenders:

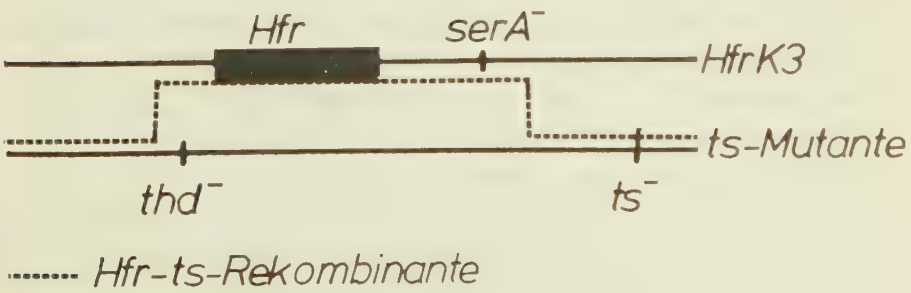
Da die ts-Mutanten thd-auxotroph sind, bietet sich wegen der guten Selektionsmöglichkeit der Integrationspunkt HfrK3 an, der in einem Stamm mit der Auxotrophie serA integriert ist: Die Marker thd und serA sind bei 61 min der Sal.tm.-Genkarte nahe benachbart; der HfrK3-Integrationspunkt liegt dazwischen (Abb. 31). Da gegen den

Hfr-Spenderstamm in der geplanten Kreuzung keine Selektionsmöglichkeit besteht, habe ich den Hfr-Stamm mit Nitrosoguanidin mutagenisiert und eine rückmutantenfreie Auxotrophe isoliert, den Stamm W112 (Hfr, serA, rfa, aux) mit der nicht identifizierten Auxotrophie aux^-. Die anderen Marker konnten getestet werden: Der Stamm W112 ist MS2-sensitiv (enthält den F-Faktor), bildet im Stempeltest mit dem Stamm 4412 pro^+-Rekombinanten, mit dem Stamm T4/2S aber keine thd^+-Rekombinanten; er ist also HfrK3, da ein später Marker nur selten geschoben wird. Er ist H5-sensitiv (Sal.tm.), FO-resistent (rfa) und enthält zusätzlich zu den ursprünglichen Markern Hfr und rfa noch eine Auxotrophie.

b) Kreuzungen:

Der Stamm W112 wird mit den ts-Mutanten nach folgendem Kreuzungsschema gekreuzt: gesucht wird die Rekombinante Hfr, ts^-, ser^- und thd^+.

Kreuzungsschema:



Etwa 50% der($thd^+ser^-ts^-$)-Isolate sind MS2-sensitiv und zeigen mit den Stämmen 4412 viele und mit 1065 wenig prototrophe Rekombinanten im Stempeltest (pro^+ bezw. his^+). Hfr-Derivate wurden von den ts-Mutanten ts7, ts13, ts40, ts66 und ts77 hergestellt (Hfr-ts7, Hfr-ts13, Hfr-ts40, Hfr-ts66 und Hfr-ts77) und mit je 15 Str-resistenten Auxotrophen (siehe Tab. 9) gekreuzt, die Rekombinanten über Einzelkolonien gereinigt und auf T.-Sensibilität geprüft. Die Häufigkeit der Korekombination ist für alle Kreuzungen in der Tab. 9 aufgeführt. In der Genkarte Abb. 31 sind alle verwendeten Marker eingetragen.

Den hohen Korekombinationshäufigkeiten der Tab. 9 nach zu schließen liegt der ts-Marker der Mutante ts7 zwischen 29 und 61 min auf der Genkarte von Sal.tm.. Die ts-Marker der Mutanten ts13 und ts40 müßten zwischen 34 und 58 min liegen. Die Mutante ts66 würde zwischen 90 und 3 min kartieren und die Mutante ts77 irgendwo zwischen 90 und 7 min. Dieser Test liefert also sehr ungenaue Ergebnisse, die aber immerhin einen Anhaltspunkt für die Genpositionen ergeben. Der Vorteil dieses Tests liegt darin, daß bei der Isolierung der Rekombinanten kein Selektionsdruck auf den ts-Marker ausgeübt wird. Das verhindert die zufällige Isolierung von ts^+-Rückmutanten, die das Ergebnis verfälschen könnten. Es scheinen aber noch unbekannte Effekte der Empfänger eine Rolle bei der Ausprägung des ts-Phänotyps zu spielen, da die Korekombinationshäufigkeiten mit der Entfernung vom Maximum nicht gleichmäßig zu- und abnehmen. Solche Effekte lassen sich nur durch

Prüfung der Rekombinationshäufigkeiten verschiedener Marker in einem polyauxotrophen Stamm umgehen (siehe nachsten Abschnitt).

Tabelle 9: Korekombinationshäufigkeiten mit dem ts-Marker

Stamm	Marker	min	Hfr-ts7	Hfr-ts13	Hfr-ts40	Hfr-ts66	Hfr-ts77
leuS	leu	3	2	10		60	50
4412	prO	7	0	1,5	2	5	60
1093S	pyrD	29	40		0		50
1020	pyrF	34	60	90	0		50
1061	trp	34	30	11		13	0
1025	trp	34		68/0	30	0	10
endo	his	44	50	92	0	2	55
1103S	metG	46	50	70	20		0
1028S	purF	51	30		0		0
endo	cysA	52	90	100		0	0
1101A	pheA	58	95	87	60		
T4/2S	thyA	61	65/15	58	0		
1095S	argE	69	0	50/0	0		2
1021	cysE	79	25	25	0		
1026	metE	83	0	2		1	1
purDS	purD	90				10	
1025	metA	90		0	0	70	25

In der Tabelle aufgetragen sind die Korekombinationshäufigkei-

ten aus den Kreuzungen der ts-Hfr-Stämme mit verschiedenen Auxotrophen. Die Zahlen in der Tabelle bedeuten die Häufigkeit in Prozent, mit der prototrophe Rekombinanten der angegebenen Auxotrophiemarker gleichzeitig temperatursensibel geworden sind. Der eingezeichnete Pfeil bezeichnet die Reihenfolge, mit der die Marker in den Empfängerstamm geschoben werden (nach Sanderson und Hartmann 1978).

c) Übertragung der Marker ts13 und ts77 in den polyauxotrophen polA-Stamm W1O6

Um die Korekombinationshäufigkeiten aus einem einzigen Kreuzungsansatz bestimmen zu können und damit Unterschiedlichkeiten des genetischen Hintergrundes auszuschließen, werden die beiden Stämme Hfr-ts13 und Hfr-ts77, die in den Pulsversuchen am besten den erwarteten dna_{ts}-Charakter zeigten, mit dem polyauxotrophen Stamm W1O6 gekreuzt.Es werden jeweils möglichst viele Rekombinanten der Marker polA, leu, pro, his oder thd selektiert und auf gleichzeitige T.-Sensibilität geprüft.

Mutante ts13:

Aus der Kreuzung mit dem Stamm Hfr-ts13 werden insgesamt 256 Wildtyprekombinanten für die verschiedenen Marker isoliert. Aber nur eine Rekombinante, die auf den Marker his^+ selektiert worden ist, ist gleichzeitig ts. Sie hat noch alle anderen Marker des Stammes W1O6: leu^-, pro^-, thd^-, Str^R und ist sensitiv für MMS. Da sowohl der Spender Hfr-ts13 wie der Empfänger W1O6 (polA) MMS-sensitiv ist, muß ein anderes Kriterium

für den polA-Marker herangezogen werden, denn es könnte evtl. zusammen mit dem ts13-Gen die MMS-Sensitivität übertragen worden sein. Glücklicherweise sind die Plaques der P22-erf-Phagen auf polA-Stämmen fast unsichtbar, während sie im Gegensatz dazu auf dem Stamm Hfr-ts13 normal groß sind. Die Plaques dieses Phagen auf der Rekombinante aber sind fast unsichtbar, sodaß also auch der polA-Marker noch vorhanden ist. Außerdem ist die MMS-Sensibilität der Mutante ts 13 von der T.-Sensibilität durch Transduktion und Rückmutation trennbar; denn insgesamt 81 MMS-resistente bezw. ts^+-Transduktanten sind temperatursensibel bezw. MMS-sensitiv; und 32 ts^+-Rückmutanten sind MMS-sensitiv.

Die gefundene Rekombinante gibt also einen Hinweis dafür, daß der Marker ts13 dem his-Gen (44 min der Genkarte) benachbart ist. Außerdem scheint eine ts-polA-Doppelmutante lebensfähig zu sein (die gefundene Rekombinante), was zumindest einen Defekt im Ligasegen (51 min der E.coli-Genkarte) ausschließt (Horiuchi und Nagata 1974).

Mutante ts77:

Aus der Kreuzung Hfr-ts77 x W106 werden 450 Rekombinanten der verschiedenen Marker getestet; 6 davon sind temperatursensibel und haben folgende Genotypen:
(siehe Tab. 10, nächste Seite)

Tabelle 10: Genotypen der temperatursensiblen Rekombinanten: (Hfr-ts77xW1106)

Marker	Str^S	polA	ts	leu	pro	his	thy
Rekombinante							
1	+	+	+	-	-	(+)	-
2	+	(+)	+	-	-	-	-
3	-	+	+	-	-	-	-
4	-	(+)	+	+	-	-	-
5	-	(+)	+	+	-	-	-
6	-	-	+	-	(+)	-	-
Kartenposition min	72	85	?	3	7	44	61

Die selektierten Marker sind in der Tabelle eingekreist, mit + sind die aus dem Spender einrekombinierten Marker gekennzeichnet.

Da 5 von 6 Rekombinanten gleichzeitig mit dem polA-Gen des Spenders den ts-Marker einrekombiniert haben, ist die Spalte für den ts-Marker neben der polA-Spalte eingetragen. Nach den Ergebnissen dieses Versuchs wäre diese Eintragung sowohl links wie rechts von polA gerechtfertigt, da bei 2 Rekombinanten zusammen mit dem ts-Marker der links von polA liegende Str-Marker (Rekombinante 1 und 2) bei zwei anderen Rekombinanten der rechts von polA liegende leu-Marker (Rekombinante 4 und 5) ausgetauscht wurde.

Bei den Rekombinanten 5 (his^+) und 6 (pro^+) muß ein Doppelaustausch stattgefunden haben, wenn man annimmt, daß der ts-Marker dem polA-Gen benachbart

ist, was 5 Rekombinanten nahelegen. Auffälligerweise sind in beiden Fällen die vom polA-Gen durch Empfänger-eigene Marker getrennten Spendermarker his und pro die selektierten Marker. Und da der Spender Hfr-ts77 Startpunkt und Schieberichtung des Stammes Hfr-K3 besitzt, enthält eine Empfängerzelle mindestens die gesamte Spender-DNS, die dem selektierten Marker entgegen dem Uhrzeigersinn bis 61 min der Genkarte vorangeht (in dieser Reihenfolge sind die Marker in der obengezeigten Tabelle aufgeführt). Aus diesem Grund ist der Doppelaustausch der Rekombinanten 1 und 6 auch nicht unwahrscheinlich. Eine Nachbarschaft der Gene ts77 und polA ist daher nicht ausgeschlossen.

Die einzige Rekombinante aus der Kreuzung W1O6 x Hfr-ts13 deutet auf die Region um das his-Gen hin, welche bei 44 min der Genkarte liegt. Die Wahrscheinlichkeit für eine gleichzeitige Übertragung des ts- und des his-Gens scheint aber sehr gering zu sein. Dieses Ergebnis bestätigt die Korekombinationsdaten des ersten Versuchs, die eine erhöhte Rekombinationshäufigkeit für das ts-Gen zwischen 34 und 58 min vermuten lassen. Wahrscheinlich ist die Mutation ts13 auch gleichzeitig mit einem Defekt in der PolI lebensfähig, was einen Defekt der Ligase ausschließt.

Die Ergebnisse mit der Mutante ts77 widersprechen den Korekombinationsdaten: das Gen ts77 sollte sehr nahe dem polA-Gen (85 min) benachbart sein, doch zeigt der ebenfalls bei 85 min liegende Marker metE nur eine Kopplungshäufigkeit von ca. 1%. Dieser Wider-

spruch läßt sich durch die bis jetzt zur Verfügung stehenden Daten nicht klären. Aber auch hier scheint eine Doppelmutante ts77 - polA lebensfähig zu sein (Isolat 6).

2. Chromosomentransfer

Bei diesen Versuchen dienen, umgekehrt wie bei der Korekombination, die ts-Mutanten als Empfänger. Die ts^+-Spender sind Hfr-Stämme mit verschiedenen Schieberichtungen und Startpunkten des Chromosomentransfers. Da Marker, die spät in den Empfänger geschoben werden, mit deutlich geringerer Häufigkeit zu Rekombinanten führen, lassen sich durch Vergleich der Ergebnisse mit verschiedenen Hfr-Stämmen Rückschlüsse auf die Kartenposition des ts-Gens ziehen.

Die Rekombinanten werden durch direkte Selektion des ts^+-Phänotyps gefunden, was die Auswertung bei manchen Stämmen, die häufig rückmutieren, sehr erschwert.

a) Stempeltechnik: (nach Low 1972)

Auf einer NA-Platte wachsende log-Kulturen von verschiedenen Hfr-Stämmen von Sal.tm. werden auf einen Rasen von Empfängerbakterien (Str^R) gestempelt. Die Chromosomenübertragung erfolgt hier zwischen ruhig nebeneinanderliegenden Zellen und ist daher viel häufiger als in Flüssigkulturen. Es wachsen unter den gewählten selektiven Bedingungen (Minimalmedium für Auxotrophien oder 43° für ts-Marker) nur Rekombinanten und Rückmutanten. Der Vorteil dieser Methode liegt weiterhin darin, daß sich geringe Rekombinantenzahlen auch bei häufigem Auftre-

ten von Rückmutanten noch feststellen lassen, da das begrenzte Rekombinantenareal von einem gleichmäßigen Rückmutantenmuster umgeben ist. Rekombinanten treten bei diesem Test nur für Marker auf, die sehr bald in den Empfänger geschoben werden (frühe Marker).

Die Startpunkte und Schieberichtungen (Abb, 31) der verwendeten Hfr-Stämme HfrA, B2, K3, K4, K5, K10 und FS21 wurden mit Hilfe der auch in Abschnitt D1 verwendeten Str-resistenten Auxotrophen im Stempeltest überprüft und potente Hfr-Einzelkolonien isoliert.

Jede ts-Mutante wurde in einem parallelen Test jeweils mit dem thd-Marker getestet, um sicherzustellen, daß Chromosomentransfer und Rekombination stattfinden (Daten nicht gezeigt). Die Hfr-Stämme HfrA und HfrB2 zeigen durchschnittlich viel weniger, der Hfr-Stamm FS21 sehr viel mehr Rekombinanten als die Hfr-Stämme der K-Serie. Daher kommt das manchmal widersprechende +-Zeichen beim FS21-Stamm, wenn beim B2-Stamm keine Rekombinanten auftreten.

Tabelle 11: Hfr-Stempeltest

ts-Stamm	7	13	40	77	80	107	
HfrA	+	+	+	+	(+)	(+)	
HfrK3	+	+	-?	+	+	+	
HfrK4	+?	-	-	-	+	-	
HfrK5	(+)	(+)	+	-	(+)	(+)	+ viele (+) wenig - keine Rekombinanten
HfrK10	-	-	-	-	-	-	
HfrB2	-	(+)	(+)	-	(+)	-	
HfrFS21	+	(+)	(+)	(+)	-	-	

Aus der Tabelle 11 lassen sich folgende Ergebnisse ablesen:

Die Mutante ts77 z.B. zeigt ts^+-Rekombinanten mit den Hfr-Stämmen HfrA und HfrK3. Diese beiden Hfr-Stämme schieben, beginnend bei 81 bezw. 61 min die DNS im Uhrzeigersinn in den Empfänger (Abb. 31). Da sowohl HfrA wie HfrK3 Rekombinanten bildet, liegt der ts-Marker rechts von 81 min. HfrK4 zeigt keine Rekombinanten, schiebt aber ebenso im Uhrzeigersinn, beginnend bei ca. 0 min, sodaß der Genbereich für den ts-Marker auf die Kartenregion 81 - 0 min eingegrenzt ist. Die Grenze kann man nach links noch enger ziehen, da der Stamm HfrK10, der die DNS gegen den Uhrzeigersinn beginnend bei ca. 86 min überträgt, und ebenso wie HfrK4 keine ts^+-Rekombinanten bildet. HfrK5 und HfrB2 schieben den ts^+-Marker also schon relativ spät und zeigen deshalb keine Rekombination. Der Marker ts77 kartiert also nach diesem Versuch zwischen 86 und 0 min der Genkarte von Sal.tm., was mit dem Ergebnis des Korekombinationsversuchs mit dem Stamm W106 (nahe polA, 85 min) übereinstimmt. In ähnlicher Weise lassen sich die Genpositionen für die ts-Gene der anderen Mutanten bestimmen: die Marker der Stämme ts7 und ts80 scheinen rechts von 0 min (HfrK4!) bis 34 min (HfrB2!) zu kartieren, die Marker ts13, ts40 und ts107 zwischen 86 und 0 min wie ts77. Für die Mutante ts13 und ts40 widerspricht dies dem Ergebnis des Korekombinationsversuches, der eine Kartenposition von 34 - 58 min für beide Mutanten ergab. Dem Korekombinations-Ergebnis für die Mutante ts7 (29 - 61 min) wird nicht widersprochen, der Bereich allerdings auf ca. 29 - 34 min eingeschränkt.

b)Interrupted mating:

In diesem Versuch wird der Chromosomentransfer in Flüssigmedium durchgeführt und kann zeitlich exakt mechanisch unterbrochen werden (siehe "Material und Methoden"). Leider ist die Häufigkeit des Transfers bei Sal.tm. so gering, daß trotz vieler Ansätze nur in zwei Versuchen wenige Rekombinanten auftraten: ein negatives Ergebnis spricht also nicht gegen das frühe Auftreten des untersuchten ts-Markers. Auch Vortests mit den Auxotrophiemarkern des Stammes W1O6 zeigten, daß das interrupted mating nicht immer erfolgreich ist. Die gefundenen Rekombinantenzahlen mit den Markern ts13 und ts77 sind in der Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: interrupted mating

Hfr		A	K3	K4	K5	K1O
ts13	5 min	4	5	O		O
	10 min	9	7	O		1
	20 min	60	O	O		1
	30 min	45	O	O		O
ts77	10 min	O(3)	1(1)	1(O)	4(3)	1(O)
	20 min	O(6)	20(2)	O(O)	1(O)	O(1)
	40 min	3(22)	55(3)	6(O)	15(O)	1(O)
	80 min	4(22)	127(3)	1(1)	9(O)	1(O)

Die Rekombinantenzahlen aus den Kreuzungen der Mutanten ts13 und ts77 mit verschiedenen Hfr-Stämmen, zu verschiedenen Zeiten unterbrochen. Plattierung auf Vollmedium bei 43^{O}; in Klammern das Ergebnis eines unabhängigen Parallelversuchs: Plattierung auf supplementiertes Minimalmedium bei 43^{O}.

Dieser Versuch wurde nur mit den Mutanten ts13 und ts77 als Empfängern durchgeführt. Wie die Zahlen der Tabelle 12 zeigen, werden die Ergebnisse, die mit der Stempeltechnik erzielt wurden, bestätigt:

Der ts-Marker der Mutante ts13 zeigt nur in der Kreuzung mit HfrA Rekombinanten, mit allen anderen Hfr-Stämmen dagegen keine. Da der Stamm HfrA ein sehr schlechter Spender ist, deutet das auf eine Kartenposition sehr bald nach dem Startpunkt von HfrA im Uhrzeigersinn hin (Abb. 31).

Für den ts-Marker der Mutante ts77 wurde dasselbe Ergebnis wie im Korekombinationsversuch gefunden: Kartenposition zwischen 86 und 0 min.

Über den Zeitpunkt des Eintretens des ts^+-Markers in den ts^--Empfänger kann aus keinem der Experimente eine Aussage gewonnen werden.

3. F-Duktion der ts-Mutanten mit Hilfe von F'-Plasmiden von E.coli:

Die verschiedenen F'-Plasmide enthalten im F-Faktor integriert Teile des E.coli-Chromosoms. Mit Hilfe der verwendeten Plasmide lassen sich also definierte Merodiploide herstellen; die chromosomalen Gene auf den F'-Faktoren werden abgelesen und können nicht funktionierende Genprodukte des Chromosoms komplementieren, allerdings nur bei rezessiven Mutationen (z.B. dnaS, Konrad und Lehmann 1975), nicht dagegen bei dominanten Defekten (z.B. dnaA, Zahn et al. 1977)

Auch auf diese Weise können die gefundenen ts-Mutationen in Sal.tm. kartiert werden, wenn sie durch E.coli-Gene

komplementiert werden können. Die größte Schwierigkeit liegt auch hier wieder in der geringen Häufigkeit des Transfers, die wahrscheinlich hauptsächlich durch die Unterschiedlichkeit der Restriktions- und Modifikationssysteme beider Genera verursacht wird. Deswegen versuchte ich, die F'-Faktoren aus E.coli in Salm.tm.-Stämme zu transferieren, die dann in der Kreuzung mit den ts-Mutanten als Spender fungieren würden. Dies gelang jedoch nur im Fall des F'lac-Episoms (W109), auf dem das dnaZ-Gen von E.coli liegt. Die Anwesenheit des F-Faktors wurde durch die Sensitivität für den Phagen MS2 nachgewiesen, sowie durch die Ausprägung des lac-Operons, das in Sal,tm. fehlt.

a) F-Duktion mit einem Sal.tm.-F'lac-Spender:

Der Stamm W109 wurde mit Str-resistenten Derivaten der Stämme ts7, ts13, ts77, ts87, ts91 (Transduktionsgruppe ts80) und TB37 gekreuzt. Doch keines der je 6 - 10 lac^+-Derivate der ts-Stämme war temperaturresistent.

b) F-Duktion E.coli - Sal.tm:

Da die F-Duktion von E.coli nach Sal.tm. mit so geringer Häufigkeit stattfindet, muß ein Selektionssystem angewendet werden, das das Wachstum der Spender- wie der Empfängerzellen vollständig verhindert. Nur Kreuzungsprodukte dürfen wachsen, wenn Komplementation zwischen dem dna-Gen auf den F'-Faktor und der defekten Replikationsmaschinerie

des Empfängers stattfindet. Zur Abtötung des E.coli-Spenders nützte ich die strikte Sensitivität dieser Zellen gegen das Antibiotikum Tetracyclin (TC) und gegen ein T-Phagen-Gemisch aus. DieSal.tm.-Empfänger sind von Natur aus resistent gegen T-Phagen, müssen aber noch TC-resistent gemacht werden. Dies wurde durch Transduktion erreicht (siehe "Methoden 2f"). Da der Empfängerstamm bei diesem Versuch absolut rückmutantenfrei in der T.-Sensibilität sein muß, kommt nur die Mutante ts13 in Frage.

Die Kreuzung der TC-resistenten Mutante ts13 mit den im Abschnitt "Material a)" aufgeführten F'-Stämmen von E.coli, auf denen alle bisher bekannten dna-Gene von E.coli codiert sind, lieferte in keinem von 3 Versuchen temperaturresistente Kreuzungsprodukte. Dies schließt jedoch nicht aus, daß das ts13-Gen einem dna-Gen von E.coli nicht doch analog ist. Möglicherweise ist es dominant oder durch das analoge E.coli-Genprodukt nicht komplementierbar.

4. Versuche zu Identifizierung mit dem dnaB-Gen

a) Suppression durch Pl-Lysogenie:

Die Mutanten ts13 und ts77 scheinen zwischen 86 und 0 min der Genkarte zu kartieren. In dem analogen Bereich von E.coli liegen die dna-Genorte dnaB und dnaC/D. Da der dnaC/D-Genort in Sal.tm. wegen fehlender analoger Nachbargene nicht kotransduziert werden kann,habe ich zunächst den dnaB-Genort ausgewählt. Für dnaB-Mutanten gibt es in E.coli zwei einfache zu prüfende Kriterien: 1. Suppression durch Pl-bac-

Phagen, 2. Kotransduktion mit malB durch den Phagen P1.

Fast alle dnaB-Mutanten von E.coli können durch den Phagen P1-bac supprimiert werden (d'Ari et al. 1975). In P1-bac-Lysogenen wird das ban-Produkt des Phagen exprimiert, das mit dem dnaB-Produkt der Zelle aktive Heteromultimere bildet oder in Homomultimeren für das temperaturdefekte dnaB-Protein substituiert (Lanka et al. 1978).

Wegen der Ähnlichkeit von E.coli und Sal.tm. könnte es möglich sein, durch Lysogenisierung mit P1-bac-Phagen und Suppression des ts-Charakters schnell und einfach dnaB-Mutanten bei Sal.tm. zu identifizieren.

Zur Kontrolle der Phagenstämme und der Methode habe ich eine E.coli-dnaB-Mutante mit P1-bac und P1-bac-ban (mit defektem ban-Produkt) lysogenisiert. Der dnaB-Stamm von E.coli wird durch P1-bac supprimiert, nicht aber durch P1-bac-ban: die dnaB-Mutante wächst bei 43° nur als P1-bac-Lysogene.

P1-bac-Lysogene wurden dann von 20 der ts-Mutanten, u.a.auch ts13 und ts77 hergestellt. Der bac-Genotyp des in Sal.tm. LT-2 gezogenen P1-Lysates konnte durch erneute Lysogenisierung und Suppression des dnaB-Stammes von E.coli überprüft und bestätigt werden. Lysogenie für den Phagen wurde nur durch die durch den P1-Phagen übertragene CM-Resistenz getestet. Spontane CM-Resistenz wurde bei den Versuchen niemals beobachtet.

Bei allen ts-Mutanten wurden 10 unabhängig isolierte Lysogene auf T.-Sensibilität geprüft: keine einzige der getesteten Mutanten wurde durch den Phagen temperaturresistent wie die dnaB-Mutante von E.coli E10. Das heißt, daß sich entweder unter den geprüften Mutanten keine dnaB- Mutante befindet, oder daß das P1-ban-Produkt einen Defekt im dnaB-Protein von Sal.tm. nicht supprimieren kann, da die Proteinstruktur bei Sal.tm. von derjenigen in E.coli abweicht.

b) Kotransduktion mit malB:

Transduziert man E.coli-malB-Mutanten mit einem P1-Phagenlysat, das auf einer dna-Mutante gezogen wurde, so sind 1 - 30% (d'Ari et al. 1975) oder nach anderen Angaben 10 - 25% (Wechsler et al. 1973) der mal^+-Transduktanten temperatursensibel. Die beiden Gene dnaB und malB sind also mit dem Phagen P1 kotransduzierbar.

Da es in Sal.tm. einfacher ist, mit dem Phagen P22 zu transduzieren, habe ich zunächst dieses versucht.

Kotransduktion mit dem Phagen P22:

Eine Phagenmutante mit erhöhter Transduktionshäufigkeit, HT12/4 (Schmieger 1972), wird auf den Mutanten ts13 und ts77 vermehrt. Mit diesen Lysaten wird eine malB-Mutante transduziert (siehe "Methoden f"). Keine von 190 (für die HT12/4:ts13-Transduktion), bezw. 200 (für die HT12/4:ts77-Transduktion) Transduktanten ist temperatursensibel. Die Kotransduktionshäufigkeit ist mit diesem Phagen kleiner als 0,5%. Es ist also nicht

feststellbar, ob Kotransduktion dieser beiden ts-Marker mit dem malB-Gen durch den P22-Phagen überhaupt nicht möglich ist, oder ob sie weiter als eine Phagen-Genomlänge von malB entfernt sind. Da das Genom des Phagen P22 nur etwa halb so groß ist wie das des Phagen P1, ist die zweite Möglichkeit bei der geringen Kotransduktion mit P1 auch durchaus denkbar.

Kotransduktion mit dem Phagen P1:

Um die Kotransduktion auch mit dem größeren Phagen P1 durchzuführen, wurden P1-sensible Derivate der Mutanten ts13, ts77 und ts80 mit dem hitzeinduzierbaren Phagen P1CMc1100 lysogenisiert und durch T.-Schock induziert (siehe "Methoden d"). Die erreichten P1-Titer sind sehr niedrig, weswegen ich in der folgenden Transduktion nur wenige Transduktanten erhielt. Die Ergebnisse sind folgende:

	mal^+	ts	%Kotransduktion
ts13	110	0	$<1\%$
ts77	78	9	ca. 10%
ts80	6	0	(0)

Die temperatursensiblen Isolate der Transduktion mit dem Lysat der Mutante ts77 wurden genauer überprüft: sie sind alle ts^-, cys^- (vom malB-Stamm), mal^+, thd^+ (also nicht Spenderzellen aus Verunreinigungen des Phagen-Lysates) und enthalten keinen induzierbaren P1-Prophagen (P1c1100-Lysogene wachsen nicht in 43° weil der Phage

induziert wird). Damit ist sichergestellt, daß diese Isolate wirklich temperatursensible mal^+-Transduktanten des malB-Stammes sind. Der ts-Marker des Stammes ts77 ist somit zu etwa 10% mit dem malB-Genort durch den Phagen P1 kotransduzierbar und liegt 1 - 2 min rechts oder links von malB, könnte also mit dem dnaB-Gen von E.coli identisch sein.

Nicht mit malB kotransduzierbar scheint der ts13-Genort zu sein. Für ts80 ist die Stichprobenzahl viel zu klein für eine Aussage.

IV. DISKUSSION

Schon in meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, daß zumindest ein Teil der isolierten Mutanten den gewünschten dna_{ts}-Phänotyp hat. Dieser ts-Defekt wird nun in der vorliegenden Arbeit für einige Mutanten genauer untersucht. Dabei wird wegen der möglichen Vielzahl der betroffenen Funktionen mehr Wert auf ein breitgestreutes Spektrum von Untersuchungen der verschiedenen Mutanten gelegt als auf die detaillierte Charakterisierung einer einzelnen. Mutanten, die dabei als Schnellabschalter der DNS-Synthese charakterisiert werden, behandle ich bei der genetischen Charakterisierung bevorzugt, da sie für eine Untersuchung der Wirtsabhängigkeit des P22-Phagen besonders interessant sind.

Die aus Pulsexperimenten gewonnenen Kurven lassen sich nur indirekt mit den aus akkumulierenden Messungen gewonnenen Kurven vergleichen, wie sie von allen dna_{ts}-Mutanten bei E.coli beschrieben wurden (Zitate siehe Einleitung). Pulskinetiken der DNS-Synthese nach T-shift kann ich nur von der dnaA-Mutante TB37 in Sal.tm. (Backhaus und Schmieger, im Druck, und diese Arbeit) und von den E.coli-Mutanten dnaC2 und dnaA nach Rückshift zum Vergleich heranziehen (Evans und Eberle 1975).
Aus den im Abschnitt "Ergebnisse" beschriebenen Daten versuche ich nun im folgenden, Schlüsse auf die Defekte in den Makromolekülsynthesewegen der einzelnen Mutanten zu ziehen. Dabei liegt es nahe, die untersuchten Stämme aufgrund der vorliegenden Ergebnisse in folgende Gruppen einzuteilen:

1) Vergleichsstämme (T4/2 und TB37)
2) Mutanten mit einem vermutlichen Defekt in der Proteinsynthese (ts87, ts40 und ts80)
3) Mutanten mit einem vermutlichen Defekt in der RNS-Synthese (ts7, ts66 und ts107)
4) Mutanten mit einem Defekt in der DNS-Synthese (ts13 und ts77).

Bei allen Mutanten wird aber die DNS-Synthese bei der nichtpermissiven T. abgeschaltet. Für die meisten Mutanten ist die Zuordnung zu einer dieser Gruppen nur als vorläufig zu betrachten, da die Untersuchungen noch unvollständig sind. Sie reichen aber aus, um Mutanten mit einem primären Defekt in der DNS-Synthese von Mutanten mit anderen primären Defekten zu unterscheiden.

Für die nachfolgenden Interpretationen werden alle zur Verfügung stehenden Daten berücksichtigt, es wird jedoch nicht auf alle Experimente hingewiesen.

1. Vergleichsstämme

a) Der Wildtyp T4/2:

Dieser Stamm, von dem alle ts-Mutanten (außer TB37) isoliert wurden, zeigt für die RNS- und Proteinsynthese typisches Wildtypverhalten: beide Syntheseraten bleiben nach T-shift gegenüber den Vergleichsraten bei 30^{o} erhöht (Abb. 2b,c). Aber auch der DNS-Syntheseverlauf nach T-shift ist wohl als WT-Verhalten zu bezeichnen, da er zwar zunächst absinkt, aber im Verlauf des Versuchs auf dem

Niveau des 30°-Wertes erhalten bleibt (Abb. 2a). Die Lebendkeimzahl nimmt bei 43° ebenso zu wie bei 30° (Abb. 29). Die DNS des Phagen P22 wird nur bei 42° repliziert, nicht bei 43°. Unerwarteterweise ist aber die DNS-Synthese dieses Stammes bei 30° resistent gegen CM. Eine Erklärung für diese Resistenz könnte eine Entkopplung der Art sein, wie sie Kogoma und Lark (1970) zwischen Neuinitiation und Proteinsynthese unter bestimmten Bedingungen bei dna_{ts}-Mutanten von E.coli beschrieben: sie finden nach DNS-Synthesestop am DNS-Origin ein stabiles Initiationssignal, das nach Rückshift Neuinitiationen auch ohne Proteinsynthese erlaubt. Eine Mutante, die diese Eigenschaft auch ohne vorheriges Anhalten der DNS-Synthese zeigt, postulierten sie. Der Stamm T4/2 könnte solch eine Mutante sein. Diese Eigenart des Stammes T4/2 aufzuklären, könnte interessant sein, fällt aber nicht in den Themenkreis dieser Arbeit. Zumindest für die DNS-Elongation kann aber gesagt werden, daß der Stamm T4/2 als dna^+-Wildtyp zu bezeichnen ist.

b) Die dnaA-Mutante TB37:

Die Mutante TB37 zeigt im Gegensatz zum dna^+-WT T4/2 ein typisches dna_{ts}-Verhalten:
während RNS- und Proteinsynthese bei 43° aufrechterhalten bleiben (Bagdasarian et al 1972 und Abb. 3b), kommt die DNS-Synthese langsam zum Stillstand. Das dafür verantwortliche dnaA-Genprodukt ist, wie das analoge dnaA-Genprodukt von E.coli, an der Initiation der Replikation beteiligt (Bagdasarian et al 1977). Auch die Zellteilung, die mit der Termination gekoppelt ist (Louarn et al 1977), geht noch eine Zeitlang weiter und kommt dann zum Stillstand. DNS-Abbau und damit eine Inaktivierung der LKZ findet nicht statt, da alle Chromosomen komplett sind und keine offenen Enden

oder einzelsträngigen DNS-Teile vorliegen (Bagdasarian et al 1977).

Da Proteinsynthese für die Initiation der Replikation notwendig ist (Gross 1977), wirkt CM mit ähnlicher Inaktivierungskinetik hemmend auf die DNS-Synthese wie T-shift (Abb. 3a). Die Verzögerung bis zum Beginn der Inaktivierung ist wohl dadurch zu erklären, daß CM nur die Bildung neuer Initiationskomplexe verhindert (Zyskind und Smith 1977), aber meist mehrere bereits gebildete Komplexe am DNS-Origin bereit sind. Diese können auch nach CM-Zugabe noch gestartet werden (Evans und Eberle 1975).

Da das dnaA-Genprodukt nach dem CM-sensiblen Schritt an der Initiation beteiligt ist (Zyskind und Smith 1977), ist es bei 43° irreversibel denaturiert: in Gegenwart von CM ist keine Reaktivierung bei Rückshift zu bemerken.

Die Mutante TB37 zeigt also alle Eigenschaften einer DNS-Initiationsmutante wie erwartet auch in den Pulsexperimenten und ist somit als Kontroll- und Vergleichsstamm sehr gut geeignet.

2) Mutanten mit einem primären Defekt in der Proteinsynthese (ts87, ts40 und ts80):

a) Die Mutante ts87:

Bei dieser Mutante wird die Proteinsyntheserate sehr schnell bis zu fast demselben Wert inaktiviert, der auch durch CM-Zugabe erreicht wird (Abb. 10b). Auch

die Reaktivierung bei Rückshift erfolgt sehr schnell (Abb. 20b). Es scheint also ein Protein verändert zu sein, das durch 43° reversibel denaturiert wird und an der Proteinsynthese direkt beteiligt ist. Dies wird durch die langsame Reaktivierung der DNS-Syntheserate bei Rückshift, sowie durch die Langsamkeit und die Parallelität der DNS-Syntheseinaktivierung durch T-shift und CM bestätigt: die Initiation der DNS-Synthese wird in beiden Fällen durch Blockierung der Proteinsynthese verhindert, neue Initiationskapazität bei Rückshift erst allmählich nachsynthetisiert. Die fehlende Reaktivierbarkeit der DNS-Synthese bei Rückshift in Gegenwart von CM ist auf diese Weise ebenso erklärbar. Obwohl das Verhalten der DNS-Syntheseraten unter den verschiedenen Versuchsbedingungen sehr dem des Stammes TB37 (dnaA$^-$) gleicht, läßt doch die Schnelligkeit der Reaktion der Proteinsynthese eindeutig auf einen temperatursensiblen Defekt in der Proteinsynthese schließen.

Daß diese Mutante trotz der Voruntersuchungen ausgewählt wurde, ist wohl auf den großen Zeitabstand der Probeentnahmen und andere Ungenauigkeiten bei der Versuchsdurchführung zurückzuführen, die daraufhin dementsprechend geändert wurde.

b) Die Mutante ts40:

Auch die Mutante ts40 scheint primär in der Proteinsynthese betroffen zu sein. Denn obwohl die DNS-Synthese oberflächlich betrachtet schneller inaktiviert wird, liegt doch die Proteinsyntheserate schon spätestens 60 min nach T-shift nur wenig über dem Meßhintergrund, der auch kurz nach CM-Zugabe erreicht wird (Abb. 6c).

Das ist durch einen Defekt in der DNS-Synthese nicht erklärbar (sie zeigt noch eine hohe Restsyntheserate). Umgekehrt aber ist die DNS-Synthese zumindest in der Initiation Proteinsynthese-abhängig. Auch die langsame Abschaltung der DNS-Synthese (Initiationstyp) ist so erklärbar, ebenso wie die Ähnlichkeit der Inaktivierung durch 43° und CM.

Das defekte Protein scheint durch 43° irreversibel geschädigt zu sein (Abb. 16b), da sich die Proteinsyntheserate nach Rückshift fast nicht erhöht. Die DNS-Syntheserate dagegen wird nach Rückshift auch mit CM sehr stark reaktiviert, was nur sehr schwer erklärbar ist. Es ist aber kein Argument gegen die primäre T-Sensibilität der Proteinsynthese.

Die Kartierungsergebnisse für diese Mutante lassen leider keinen Schluß auf einen bestimmten Genort zu. Der Phage P22 konnte in dieser Mutante leider nicht auf seine Abhängigkeit von der Wirtsfunktion geprüft werden, da die Wirts-DNS-Synthese bei 42° nicht genügend temperatursensibel war.

c) Die Mutante ts80:

Wie bei der Mutante ts40 ist auch hier die Proteinsynthese vom T-shift stärker betroffen als die DNS-Synthese. Die Wirkung der Proteinsyntheseinaktivierung auf die Initiation der DNS-Replikation wird auch hier durch die Parallelität der Wirkung von CM und 43° unterstrichen (Abb. 9a). Die Proteinsynthese wird durch 43° irreversibel geschädigt, was durch einen primären Defekt in der DNS-Synthese nicht erklärbar ist. Im Gegensatz zur Mutante ts40 geht allerdings hier die irreversible

Schädigung lebenswichtiger Prozesse noch weiter: die DNS-Synthese kann sich nach Rückshift nicht wieder erholen (Abb. 19a) und die LKZ wird durch 43° sehr stark verringert (Abb. 29). Die Inaktivierung der DNS-Synthese ist also bei dieser Mutante die Folge einer irreversiblen Schädigung wichtiger Zellfunktionen, hauptsächlich wohl der Proteinsynthese.

3. Mutanten mit einem primären Defekt in der RNS-Synthese (ts7, ts66 und ts107)

a) Die Mutante ts7:

Bei dieser Mutante wird die DNS-Synthese bei 43° nur zu 75-80% inaktiviert (Initiationstyp). Dagegen wird die RNS-Syntheserate schon bei 42° zwar langsamer, dafür aber viel stärker inaktiviert (Abb. 4b und Tab. 2), scheint also das primär betroffene Synthesesystem zu sein. Die schnellere Inaktivierung der DNS-Synthese kann dadurch erklärt werden, daß z.B. die Neusynthese von RNS-Polymerase temperatursensibel geworden ist, etwa durch die T-Sensibilität der Selbstregulation der Neusynthese (Fukuda et al 1978). Die durch Abbau allmählich immer weniger werdenden RNS-Polymerase-Moleküle würden dann nur noch die Promotoren mit der höchsten Affinität erkennen (z.B. einige starke Genpromotoren wichtiger Enzyme). Dadurch würde sowohl die schnellere Inaktivierung der DNS-Synthese (keine ori-Primer mehr, daher keine Neuinitiationen), wie die exponentielle Inaktivierung der RNS-Syntheserate

(Ein-Treffer-Kinetik durch Abbau der Polymerase-Moleküle), wie auch das verzögerte Abnehmen der Proteinsynthese (allmähliches Auslaufen der mRNS-Produktion) erklärbar.

Die DNS-Replikation des Phagen P22 ist vom defekten Protein dieser Mutante abhängig, wie es für eine rna_{ts}-Mutante erwartet werden kann. Diese Abhängigkeit, sowie auch die P22-Induktion der lysogenen Mutante durch Hitzeschock könnte in einer Mutante nur schwer erklärt werden, die in einem Protein temperatursensibel geworden ist, das ausschließlich auf die Initiation der Replikation wirkt. Durch verminderte Phagenrepressorproduktion bei geringerer Anzahl von RNS-Polymerasemolekülen wäre die Induktion aber zumindest vorstellbar. Andere Modelle sind für diese Phänomene sicher denkbar, doch scheint mir der oben diskutierte Defekt in der RNS-Polymerasesynthese eine gute Erklärung für alle beobachteten Phänomene zu sein.

Die Kartierungsergebnisse (29-34 min) liefern keinen Hinweis für eine Analogie des betroffenen Gens mit einem der RNS-Polymerase-Gene bei E.coli, die bei 66, 72 und 89 min liegen (Fukuda et al 1978). Die Analogie zu E.coli muß aber nicht notwendigerweise so weit gehen.

b) Die Mutante ts66:

Bei dieser Mutante werden DNS- und RNS-Synthese etwa gleichstark und gleichschnell durch 43^{o} inaktiviert (Tab.2 und Abb. 7). Deshalb scheint mir die RNS-Synthese das primär betroffene System zu sein, da sie auf die Initiation der DNS-Synthese Einfluß hat

(Parallelität der DNS-Inaktivierung durch CM und 43°, Abb. 7a). Bei den dna_{ts}-Mutanten jedoch bleibt die RNS-Synthese bei der nicht permissiven T. normalerweise erhalten. Gegen eine primäre T-Sensibilität der RNS-Synthese spricht auch nicht die Irreversibilität der Denaturierung des betroffenen Proteins (Abb. 17) und die starke Zunahme der LKZ nach T-shift (Tab. 3). Die Verzögerung und langsame Zunahme der Reaktivierung bei Rückshift ohne CM, sowie die mangelnde Inaktivierung der DNS-Synthese beim zweiten shift sprechen jedoch gegen eine primäre T-Sensibilität der DNS-Synthese. Wegen der schlechten DNS-Syntheseinaktivierung bei 42° konnte in dieser Mutante leider die Replikation der P22-Phagen-DNS nicht gemessen werden. Auch die Ungenauigkeit der Kartierungsergebnisse läßt keinen zutreffenderen Schluß auf den Wirkungsort der T-Sensibilität zu.

c) Die Mutante ts107:

Bei dieser Mutante wird die RNS-Synthese zwar nicht stärker, aber viel schneller inaktiviert als die DNS-Synthese (Tab. 2), sodaß wohl mit großer Wahrscheinlichkeit die RNS-Synthese das primär betroffene System sein dürfte. Dafür spricht auch die starke Verzögerung der DNS-Syntheseinaktivierung, sowie die Langsamkeit der Reaktivierung beim Rückshift und die starke Zunahme der LKZ nach T-shift.Ebenso wie bei der Mutante ts7 sollte dann auch hier der Phage P22 von der temperatursensiblen Funktion abhängig sein. Aus dem entsprechenden Versuchsergebnis (Abb. 28) kann aber

die Entscheidung über die Abhängigkeit der Phagen-DNS-Replikation nicht gefällt werden: diese Mutante ist bei 42° im Gegensatz zu 43° nicht genügend temperatursensibel.

Alle in den Abschnitten 2 und 3 beschriebenen Mutanten zeigen eine langsame Abschaltung der DNS-Synthese, die eine Folge der primären Abschaltung anderer Synthesewege sein dürfte. Diese wirken anscheinend alle auf die sehr komplexe und empfindliche Initiation der DNS-Synthese. Obwohl diese Mutanten alle im DNS-Stoffwechsel gestört sind, ist es wohl trotzdem nicht gerechtfertigt, sie als dna_{ts}-Mutanten zu bezeichnen, da andere Makromolekülsynthesewege noch stärker oder direkter betroffen sind.

4. Mutanten mit einem vermutlichen Defekt in der DNS-Synthese (ts13 und ts77)

a) Die Mutante ts13:

Diese Mutante schaltet bei T-shift die DNS-Synthese bei 42° und 43° sehr schnell bis zu 90% ab, während die RNS- und Proteinsyntheseraten überhaupt nicht, bezw. sehr wenig betroffen sind (Abb. 5). Es scheint also ein Protein temperatursensibel zu sein, das auf die Elongation der DNS-Synthese wirkt. Diese T-Sensibilität betrifft nicht die Synthese der DNS-Vorläufer, denn dann müßte wohl der Phage P22 von

der defekten Funktion der Mutante ts13 abhängig sein, was nicht der Fall ist (Abb. 25). Von diesem Phagen ist bisher nicht bekannt und auch kaum zu erwarten, daß er für eigene Enzyme der DNS-Vorstufen kodiert (Susskind und Botstein 1978).

Der temperatursensible Defekt dieser Mutante kann noch genauer charakterisiert werden:

Es werden wahrscheinlich bei der nicht-permissiven T. neue Replikationsrunden initiiert. Denn bereits eine Minute nach Rückshift zu 30° übersteigt die DNS-Syntheserate den Ausgangswert vor dem T-shift sowohl mit als auch ohne CM um etwa das 5-fache (Abb. 15). Dies ist nur möglich, wenn unter restriktiven Bedingungen neue Replikationsorte gebildet wurden, und außerdem das temperatursensible Genprodukt reversibel geschädigt ist, was hier der Fall ist.

Zusätzlich kann man sagen, daß die 90%-ige Inaktivierung der DNS-Synthese nicht eine Folge der völligen Ausschaltung von 90% der Replikationskomplexe bedeutet (während 10% aktiv bleiben); sie ist eine Folge der Reduzierung der Synthesegeschwindigkeit jedes einzelnen Komplexes auf 10%. Dies kann aus folgenden Ergebnissen geschlossen werden:

- Nach 20' in der restriktiven T. steigt die DNS-Syntheserate stark an, bleibt aber immer bei etwa 10% des 30°-Kontrollwertes. Da die Proteinsynthese unbeeinträchtigt bleibt, also auch temperatursensibles Protein neusynthetisiert wird, ist dies durch Vermehrung der Zahl der Replikationsorte sehr gut erklärbar (siehe vorigen Abschnitt), wenn jeder neugebildete Komplex bei 43° 10% der Aktivität von 30° hat.

- Die DNS wird bei 43° nicht abgebaut (Abb. 22), und die T-Sensibilität ist sofort reversibel (Abb. 15): daraus folgt, daß alle Replikationsorte stabil auf der DNS bleiben.
- Die LKZ erhöht sich in der nichtpermissiven T. (Abb. 30); daraus folgt, daß die DNS auch bei 43° normal zu biologisch aktiven Strukturen repliziert wird. D.h., daß zumindest der größte Teil der Replikationsorte normal repliziert, da inaktive Replikationsgabeln die aktiv replizierenden Enzymkomplexe anhalten würden. Die nach 20' bei 43° wieder einsetzende DNS-Syntheseaktivität ist also normale DNS-Replikation und nicht, zumindest nicht ausschließlich, Reparatursynthese.

Außerdem kann noch ausgesagt werden, daß das temperatursensible Protein der Mutante ts13 ein für die Wirts-DNS-Elongation spezifisches Enzym ist, da der Phage P22 davon unabhängig ist, oder aber, daß der Phage P22 für ein eigenes Genprodukt kodiert, das das ts13-Protein für die Phagen-DNS-Replikation ersetzen kann. Möglich ist aber auch, daß der Phage das für die Wirtssynthese defekte Protein noch benützen kann.

Die Kartierung lieferte widersprüchliche Ergebnisse. Da im allgemeinen die Stempeltechnik zuverlässiger war, kommt für das ts13-Gen die Kartenregion 85 - 0 min in Frage. In Analogie zu E.coli würden dort die Genorte dnaB und dnaC/D liegen (Abb. 31). Für beide Genorte wurden schnellabschaltende Allele der DNS-Synthese beschrieben (Geider 1976). Wegen des Fehlschlagens des P1-Kotransduktionsversuches mit dem malB-Genort ist eine Analogie zum E.coli-dnaB-Gen unwahrscheinlich. Für das dnaC-Gen ist ein ähnlicher

Kotransduktionsversuch nicht möglich. Die physiologischen Ähnlichkeiten der Mutante ts13 mit dnaC-Mutanten sind folgende:

Der Phage P22 ist vom dnaC-Genprodukt in E.coli unabhängig, wie von dem ts13-Genprodukt (Schanda-Mulfinger und Schmieger).
Die T-Sensibilität ist mit einer Entkopplung der Zellteilung verbunden, wie sie in Sal.tm. auch für eine dnaC-Mutante beobachtet wurde (Spratt und Rowbury 1971b). Allerdings konnte noch nicht geprüft werden, ob die T-Sensibilität der DNS-Synthese und die Entkopplung der Zellteilung bei 43° auf eine Mutation im selben Gen zurückzuführen ist. Jedenfalls scheint aber das analoge dnaC-Produkt von E.coli auch an der Elongation beteiligt zu sein (McMacken und Kornberg 1978), sodaß für die Mutante ts13 eine Mutation im dnaC-Genort diskutiert werden kann.

b) Die Mutante ts77:

In dieser Mutante wird durch T-shift von allen drei gemessenen Makromolekülsynthesen allein die DNS-Synthese inaktiviert. Auch diese Mutante ist also eine dna_{ts}-Mutante. Die Abschaltkinetik ist dabei schneller als beim Stamm TB37, aber langsamer als bei der Mutante ts13 (Abb. 8a). Der Phage P22 braucht das temperatursensible Protein, vermag die Wirts-DNS-Restsynthese aber nur 25 min lang völlig abzuschalten (Abb. 27). Danach erfolgt wieder ein Anstieg der Rest-DNS-Synthese auf das Niveau der nicht-infizierten Kontrolle.

Der Grund dafür ist nicht klar, könnte aber z.B. im Abbau der Phagen-DNS zu finden sein.

Der Genort ts77 ist mit dem malB-Genort durch den Phagen P1 zu etwa 10% kotransduzierbar, nicht jedoch durch P22, und liegt somit ca 1 - 2 min rechts oder links vom malB-Gen. Von den E.coli-dna-Genen liegt benachbart zu malB nur das dnaB-Gen mit P1-Kotransduktionshäufigkeiten von 1 - 30% (D'Ari et al 1975). Eine Analogie des ts77-Gens mit dem dnaB-Genort von E.coli ist also sehr wahrscheinlich.

Auch aufgrund physiologischer Daten liegt diese Analogie nahe:

- die meisten dnaB-Mutanten von E.coli sind bei Rückshift reversibel (Kogoma und Lark 1970), ts77 wahrscheinlich auch (Abb. 18).
- ihre T-Sensibilität ist meist durch hohe Salzkonzentrationen nicht supprimierbar (Ricard und Hirota 1973), wie bei ts77 auch.
- manche sind nicht MMS-sensibel (Bonhoeffer und Schaller 1965), wie ts77 auch.
- ihre LKZ wird nach T-shift inaktiviert (Gross 1972), wie auch bei ts77 ein wenig (Abb. 29).
- die unverminderte Zellteilung nach T-shift führt zu einem hohen Prozentsatz an toten Zellen (Gross 1972), wie auch bei ts77 (Abb. 30).
- dnaB-Mutanten können Initiations- oder Elongations-Mutanten sein, ts77 zeigt ein intermediäres Abschaltverhalten.

Folgende Widersprüche bleiben bei einem Vergleich der Mutante ts77 mit dnaB-Mutanten von E.coli bestehen:

- die DNS der schnellabschaltenden dnaB-Mutanten von E.coli wird in der nicht-permissiven T. abgebaut (Schuster et al 1973), nicht hingegen die DNS der Mutante ts77 (Abb. 22).

- das ban-Produkt des Phagen P1 kann die T-Sensibilität der Mutante ts77 nicht supprimieren, dagegen alle schnellabschaltenden dnaB-Mutanten von E.coli (nicht dnaB252, Schuster mündl. Mitteilung).
- der Phage P22 scheint das dnaB-Produkt von E.coli für die DNS-Replikation nicht zu benötigen (Schanda-Mulfinger und Schmieger), ist aber abhängig vom ts77-Genprodukt.

Dies alles kann durch die Verschiedenheit der dnaB-Genprodukte in Sal.tm. und E.coli und durch die evtl. langsame Abschaltkinetik der Mutante ts77 (Ähnlichkeit mit der Mutante dnaB252) erklärt werden.
Die Analogie des ts77-Genproduktes mit dem dnaB-Genprodukt von E.coli erscheint also nicht unwahrscheinlich, ist aber noch nachzuweisen. Besonders interessant erscheint in diesem Zusammenhang die Wechselwirkung der Replikationsmaschinerie des Phagen P22 mit dem ts77-Genprodukt einerseits und dem E.coli-dnaB-Genprodukt andererseits.

Ist die Mutante ts77 eine Elongationsmutante, so ist die Abhängigkeit des Phagen P22 nur dann überraschend, wenn sie den schnellabschaltenden dnaB-Mutanten in E.coli analog ist. Ist sie eine Initiationsmutante, so wäre das ts77-Genprodukt das erste gefundene Initiationsprotein, von dem der Phage P22 abhängig ist. Unter den temperenten Phagen ist bisher nur vom Phagen Mul die Abhängigkeit von einem Initiationsgen bekannt (dnaC, Toussaint und Faelen 1974).

Von allen untersuchten Mutanten sind also eindeutig nur die beiden Mutanten ts13 und ts77 im DNS-Stoffwechsel selbst defekt und zeigen eine zumindest in den ersten 2 min nach T-shift sehr schnelle Abschaltcharakteristik der DNS-Synthese. Das Verhalten der DNS-Replikation des Phagen P22 ist in beiden Mutanten überraschend: in ts13, da sich der Phage repliziert, obwohl die Elongation gestört ist, in ts77, da sich der Phage nicht repliziert, obwohl eine Analogie zu dnaB-Mutanten von E.coli sehr wahrscheinlich ist. Jedenfalls aber war die verwendete Selektionsmethode für Elongationsmutanten der DNS-Replikation erfolgreich, obwohl alle anderen untersuchten Mutanten zum Initiationstyp zu zählen sind und evtl. in der DNS-Synthese selbst nicht primär defekt sind.

Es überrascht nicht, daß für die Mutante ts77 ein Defekt in dem für den Phagen P22 so interessanten dnaB-Gen vorzuliegen scheint, da die meisten bei E.coli isolierten dna_{ts}-Mutanten dnaB-Mutanten sind (Gross 1972, Wechsler et al 1973).

Es ist zu erwarten, daß durch die hier beschriebenen und noch zu charakterisierenden dna_{ts}-Mutanten die Vorstellungen über die allgemeine DNS-Replikation vervollständigt werden können, ganz besonders aber die Modelle über die Replikation des Phagen P22 und über die phagengesteuerte Replikation von Bakterien-DNS, wie sie für die Bildung transduzierender Partikel in Sal.tm. diskutiert wird (Backhaus und Schmieger, im Druck). Ich hoffe,dazu einen Beitrag geleistet zu haben.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Nach einer Vorauswahl aus über 100 ts-Mutanten werden 8 Mutanten, die im DNS-Stoffwechsel temperatursensibel sind, näher charakterisiert. 3 Mutanten (ts7, ts66 und ts107) zeigen sich dabei zusätzlich zur DNS-Synthese in der RNS-Synthese, 3 Mutanten (ts40, ts80 und ts87) hauptsächlich in der Proteinsynthese, zwei Mutanten (ts113 und ts77) aber allein in der DNS-Synthese defekt.

Das temperatursensible Genprodukt der Mutante ts113 scheint an der Elongation der Replikation beteiligt zu sein. Die Synthesegeschwindigkeit der Replikation wird durch 42° und 43° reversibel zu 90% gehemmt. Das ts113-Protein wird von Phagen P22 nicht gebraucht, ist durch ein phageneigenes Protein ersetzbar oder in denaturierter Form für die Phagenreplikation voll aktiv. Die Analogie der ts113-Mutation zu dnaC-Mutanten in Sal.tm. und E.coli wird diskutiert.

Die Temperatursensibilität der DNS-Synthese bei der Mutante ts77 ist nicht eindeutig der Initiation oder Elongation zuzuordnen. Das temperatursensible Genprodukt ist langsam reversibel bei Rückshift und essentiell für die Replikation des Phagen P22. Der ts77-Genort ist durch den Phagen P1 mit dem malB-Genort kotransduzierbar, könnte also dem dnaB-Gen in E.coli analog sein. Diese Möglichkeit wird diskutiert.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Ahmed, N.; R.J. Rowbury
Studies of septation and separation in a mutant of Salmonella typhimurium.
Z. Allg. Mikrobiol. 14, 455-463 (1974)

Bachmann, B.J.; K.B. Low; A.L. Taylor
Recalibrated linkage map of E.coli K12.
Bact. Rev. 40, 116-167 (1976)

Backhaus, H.
Untersuchungen zur Phagen-kontrollierten Synthese der bakteriellen DNS in transduzierenden Partikeln des Salmonella-Phagen P22.
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München (1976)

Backhaus, H.; H. Schmieger
Replication and maturation of phage P22 in a mutant of Salmonella typhimurium temperature-sensitive in initiation of DNA replication.
Im Druck, Molec. Gen. Genet.

Backhaus, H.; H. Schmieger
Bacterial DNA synthesized under phage control in a DNA-defective Salmonella mutant and packaged into a special fraction of transducing particles of phage P22.
Im Druck, Molec. Gen. Genet.

Bagdasarian, M.M.; M. Zdzienicka; M. Bagdasarian
Temperature sensitive initiation of DNA synthesis in a mutant of Salmonella typhimurium.
Molec. Gen. Genet. 117, 129 - 142 (1972)

Bagdasarian, M.M.; M. Izakowska; M. Bagdasarian
Suppression of the dnaA phenotyp by mutations in the rpoB cistron of RNA polymerase in Salmonella typhimurium and Escherichia coli.
J. Bact. 130, 577-582 (1977)

Blanco, M.; L. Pomes
Prophage induction in Escherichia coli K12 cells deficient in DNA polymerase I.
Molec. Gen. Genet. 154, 287-292 (1977)

Bonhoeffer, F.; H. Schaller
A method for selective enrichement of mutants based on the high UV sensivity of DNA containing 5-bromouracil.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 93-97 (1965)

Carl, P.
Escherichia coli mutants with temperature sensitive synthesis of DNA.
Molec. Gen. Genet. 109, 107-122 (1970)

Chu, H.; M. Malone; W. Haldenwang; J.R. Walker
Physiological effect of growth of an Escherichia coli temperature sensitive dnaZ mutant at nonpermissive temperatures.
J. Bacteriol. 132, 151-158 (1977)

D'Ari, R.; A. Jaffé-Brachet; D. Touati-Schwartz;
M.B. Yarmolinski
A dnaB analog specified by bacteriophage P1.
J. Molec. Biol. 94, 341-366 (1975)

Evans, J.M.; H. Eberle
Accumulation of the capacity for initiation of
DNA replication in Escherichia coli.
J. Bacteriol. 121, 883-891 (1975)

Filip, C.C.; J.S. Allen; R.A. Gustafson; R.G. Allen;
J.R. Walker
Bacterial cell division regulation: characterization
of the dnaH locus of Escherichia coli.
J. Bacteriol. 119, 443-449 (1974)

Fukuda, R.; M. Taketo; A. Ishihama
Autogenous regulation of RNA polymerase ß subunit
synthesis in vitro.
J. Biol. Chem. 253, 4501-4504 (1978)

Geider, K.
Molecular aspects of DNA replication in Escherichia
coli systems.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 74, 55-112 (1976)

Gross, J.D.
DNA replication in bacteria.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 57, 39-74 (1972)

Higgins, N.P.; C.L. Peebles; A. Sugino; N.R. Cozzarelli
Purification of subunits of Escherichia coli gyrase and reconstitution of enzymatic activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. US 75, 1773-1777 (1978)

Hiraga, S.
Novel F prime factors able to replicate in Escherichia coli Hfr strains.
Proc. Natl. Acad. Sci. US 73, 198-202 (1976)

Hirota, Y.; J. Mordoh; F. Jacob
On the process of cellular division in Escherichia coli: III. Thermosensitive mutants of E. coli altered in the process of DNA initiation.
J. Mol. Biol.53, 369-387 (1970)

Horiuchi, T.; T. Sato; T. Nagata
Dna degradation in an amber mutant of Escherichia coli K12 affecting DNA ligase and viability.
J. Mol. Biol. 95, 271-287 (1975)

Horiuchi, T.; H. Maki; M. Sekiguchi
A new conditional lethal mutator (dnaQ49) in Escherichia coli K12.
Molec. Gen. Genet. 163, 277-283 (1978)

Israel, V.
The production of inactive phage P22 particles following induction.
Virology 33, 317-322 (1967)

Kogoma, T.; K.G. Lark
DNA replication in Escherichia coli: replication in absence of protein synthesis after replication inhibition.
J. Mol. Biol. 52, 143-164 (1970)

Konrad, E.B.; I.R. Lehmann
Novel mutants of Escherichia coli that accumulate very small DNA replicative intermediates.
Proc. Natl. Acad. Sci. US 72, 2150-2154 (1975)

Kornberg, A.
DNA synthesis.
W.H. Freeman and Company (San Francisco) 1974

Kuempel, P.L.; S.A. Duerr; N.R. Seeley
Terminus region of the chromosome in Escherichia coli inhibits replication forks.
Proc. Natl. Acad. Sci. US 74, 3927-3931 (1977)

Lanca, E.; B. Geschke; H. Schuster
Escherichia coli dnaB mutant defective in DNA initiation: Isolation and properties of the dnaB protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. US 75, 799-803 (1978)

Louarn, J.; J. Patte; J.M. Louarn
Evidence for a fixed termination site of chromosome replication in Escherichia coli K12.
J. Mol. Biol. 115, 295-314 (1977)

Low, K.B.
Escherichia coli K12 F-prime factors, old und new.
Bacteriol. Rev. 36, 587-607 (1972)

McMacken, R.; A. Kornberg
A multienzyme system for priming the replication of ØX174 viral DNA.
J. Biol. Chem. 253, 3313-3319 (1978)

Messer, W.
Initiation of DNA replication in E.coli B/r. Chronology of events and transcriptional control of initiation.
J. Bact. 112, 7-12 (1972)

Mojica-a, T.
Transduction by phage P1CM c1100 in Salmonella typhimurium.
Molec. Gen. Genet. 138, 113-126 (1975)

Ricard, M.; Y. Hirota
Effet des sels et autres composés sur le phènotype de mutants thermosensibles de Escherichia coli
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 124A, 29-43 (1973)

Saito, H.; H. Uchida
Organization and expression of the dnaJ and dnaK genes of Escherichia coli K12.
Molec. Gen. Genet. 164, 1-8 (1978)

Sanderson, K.E.; H. Ross; L. Ziegler; P.H. Mäkelä
F^+, Hfr and F' strains of Salmonella typhimurium and Salmonella abony.
Bacteriol. Rev. 36, 608-637 (1972)

Sanderson, K.E.; P.E. Hartmann
Linkage map of Salmonella typhimurium, edition V.
Microbiol. Rev. 42, 471-519 (1978)

Schanda-Mulfinger, U.; H. Schmieger
Growth of Salmonellaphage P22 in Escherichia coli dna_{ts} mutants.
(in Vorbereitung)

Schmieger, H.
Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities.
Molec. Gen. Genet. 119, 75-88 (1972)

Schuster, H.; D. Beyersmann; M. Mikolajezyk; M. Schlicht
Prophage induction by high temperatures in thermosensitive dna mutants lysogenic for bacteriophage Lambda.
J. Virol. 11, 879-885 (1973)

Schwarz, W.
Isolierung von dna_{ts}-Mutanten bei Salmonella typhimurium.
Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München (1975)

Sevastopoulos, L.G.; C.T. Wehr; D.A. Glaser
Large-scale automated isolation of Escherichia coli mutants with thermosensitive DNA replication.
Proc. Natl. Acad. Sci. US 74, 3485-3489 (1977)

Shannon, K.P.; R.J. Rowbury
Mode of growth an division of Salmonella typhimurium.
Z. Allg. Microbiol. 15, 447-456 (1975)

Slater, M.; M. Schaechter
Control of cell division in bacteria.
Bacteriol. Rev. 38, 199 (1974)

Smith, C.L.; Oishi M.
Early events and mechanisms in the induction of bacterial SOS functions: Analysis of the phage repressor inactivation process in vivo.
Proc. Natl. Acad. Sci. US 75, 1657-1661 (1978)

Spratt, B.G.; R.J. Rowbury
Physiological and genetical studies on a mutant of Salmonella typhimurium which is temperature sensitive for DNA Synthesis.
Molec. Gen. Genet. 114, 35-49 (1971)

Spratt, B.G.; R.J. Rowbury
Cell division in a mutant of Salmonella typhimurium which is temperature sensitive for DNA synthesis.
J. Gen. Microbiol. 65, 305-314 (1971)

Staudenbauer, W.L.; E. Lanka; H. Schuster
Replication of small plasmids in extracts of Escherichia coli. Involvement of the dnaB and dnaC protein in the replication of early replicative intermediates.
Molec. Gen. Genet. 162, 243-249 (1978)

Susskind, M.M.; D. Botstein
Molecular genetics of bacteriophage P22.
Microbiol. Rev. 42, 385-413 (1978)

Taketo, A.
Host genes involved in the replication of single stranded DNA phage ØK.
Molec. Gen. Genet. 148, 25-29 (1976)

Taketo, A.
Effect of cyclocytidin on Escherichia coli and lambda prophage.
J. Gen. Appl. Microbiol. 22, 281-284 (1976)

Toussaint, A.; M. Faelen
The dependence of temperate phage Mu-1 upon replication functions of Escherichia coli K12.
Molec. Gen. Genet. 131, 209-214 (1974)

Tresguerres, E.F.; H.G. Nandadasa; R.H. Pritchard
Suppression of initiation-negative strains of Escherichia coli by integration of the sex factor.
J. Bact. 121, 554-561 (1975)

Truitt, C.; J. Walker
Growth of phage lambda, ØX174 and M13 requires dnaZ (previously dnaH) gene product of Escherichia coli.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 1036-1041 (1974)

Wechsler, J.A.; V. Nüsslein; B. Otto; A. Klein; F. Bonhoeffer; R. Herrmann; L. Gloger; H. Schaller
Isolation and characterization of thermosensitive Escherichia coli mutants defective in deoxyribonucleic acid replication.
J. Bact. 113, 1381-1388 (1973)

Zahn, G.; R. Tippe-Schindler; W. Messer
Trans-dominance of dnaA mutants in Escherichia coli.
Molec. Gen. Genet. 153, 45-49 (1977)

Zyskind, J.W.; D.W. Smith
Novel Escherichia coli dnaB mutant: Direct involvement of the dnaB252 gene product in the synthesis of an origin ribonucleic acid species during initiation of a round of deoxyribonucleic acid replication.
J. Bact. 129, 1476-1486 (1977)

ABBILDUNGEN

Die Abb.1 befindet sich auf Seite 25.

Legende zu den Abbildungen 2 - 11:

Pulsexperimente zur Messung der DNS-, RNS- und Proteinsyntheseraten bei 30° und 43°, mit und ohne CM. Die Mutantennummer ist neben der Abbildungsnummer vermerkt. Der Pfeil bezeichnet den Zeitpunkt des Temperaturshifts. Eine Strichelung der Linien dient nur der besseren Unterscheidbarkeit der verschiedenen Kurven und hat keine Markierungsfunktion.

Versuchsbedingungen:

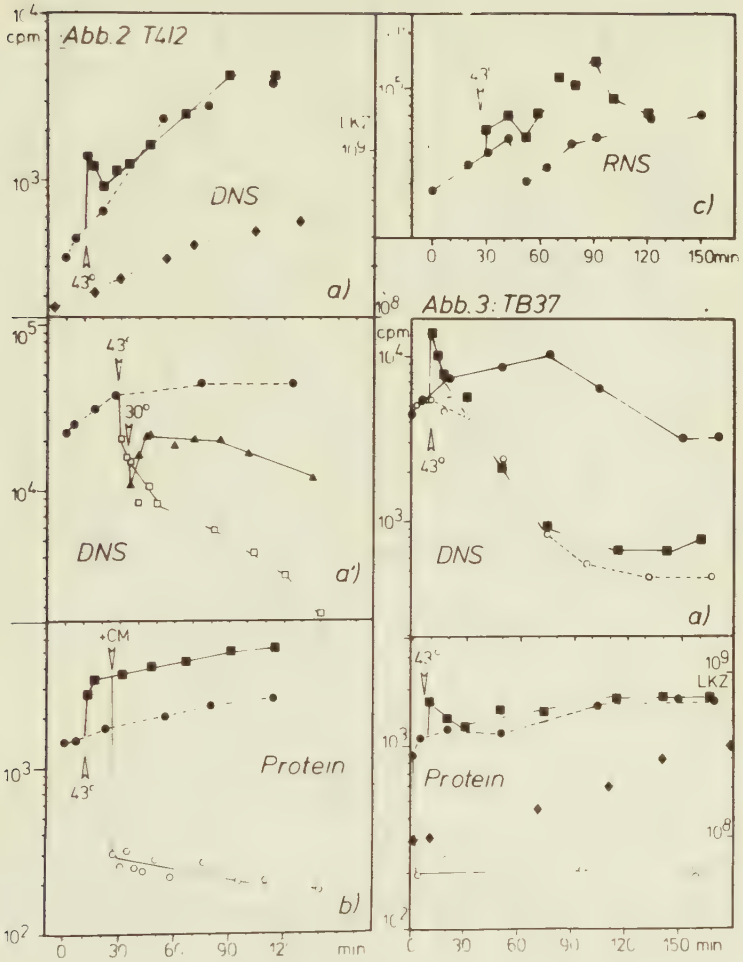


Abb. 2 T412
cpm
DNS
43°
a)
RNS
c)
0 30 60 90 120 150min
30°
DNS
a')
+CM
Protein
b)
0 30 60 90 120 min
Abb. 3: TB37
cpm
43°
DNS
a)
LKZ
Protein
0 30 60 90 120 150 min

Abb. 2 und 3

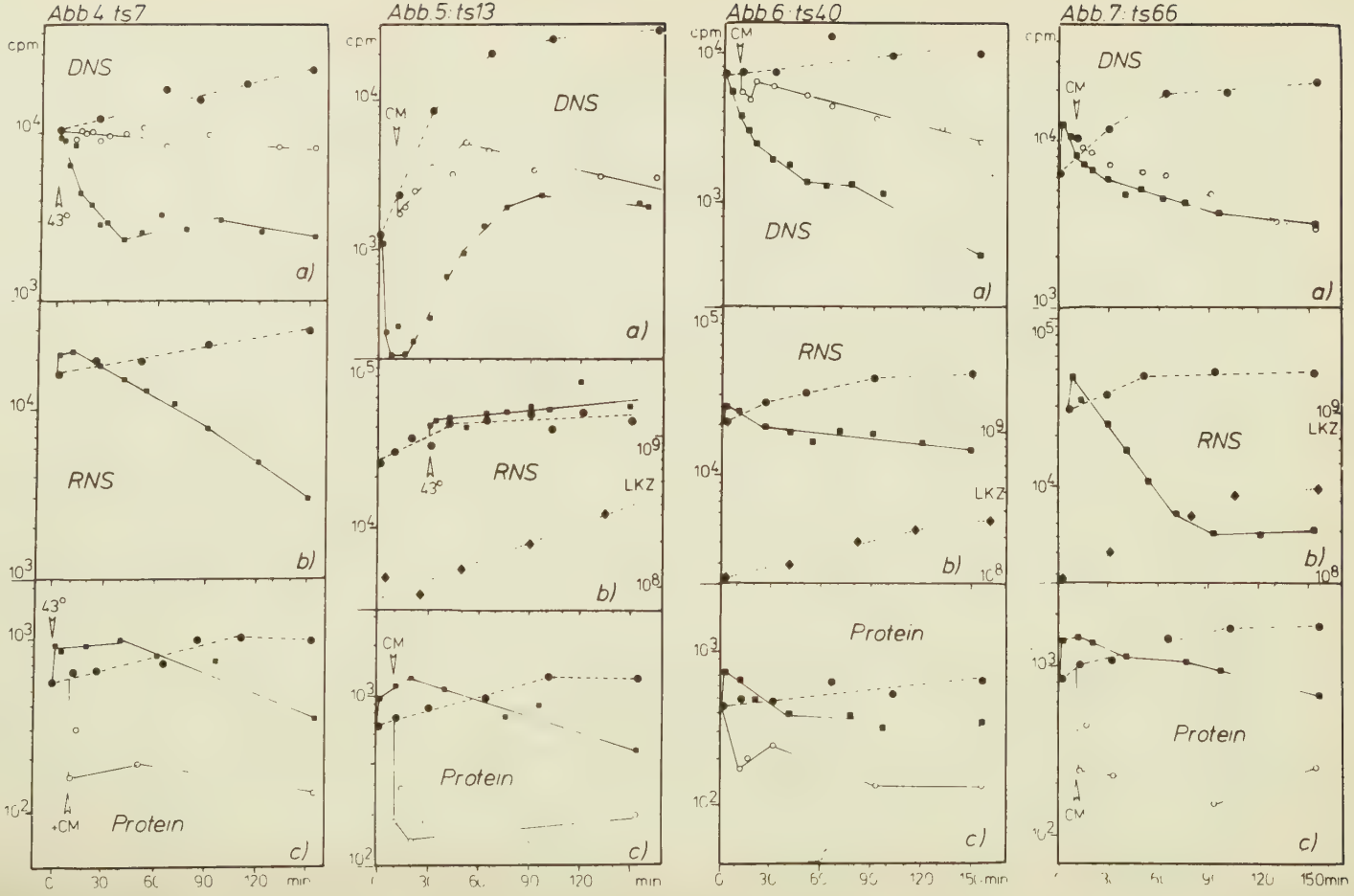


Abb 4 ts7
Abb 5 ts13
Abb 6 ts40
Abb 7 ts66
cpm
DNS
RNS
Protein
CM
43°
+CM
LKZ
a)
b)
c)
min
150min

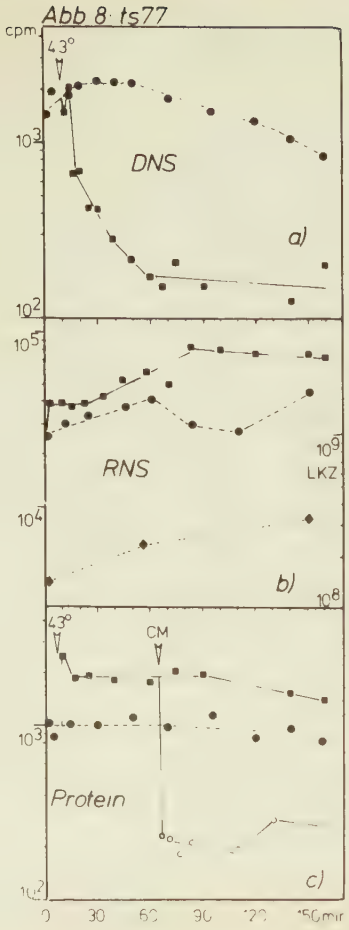


Abb 8: ts77

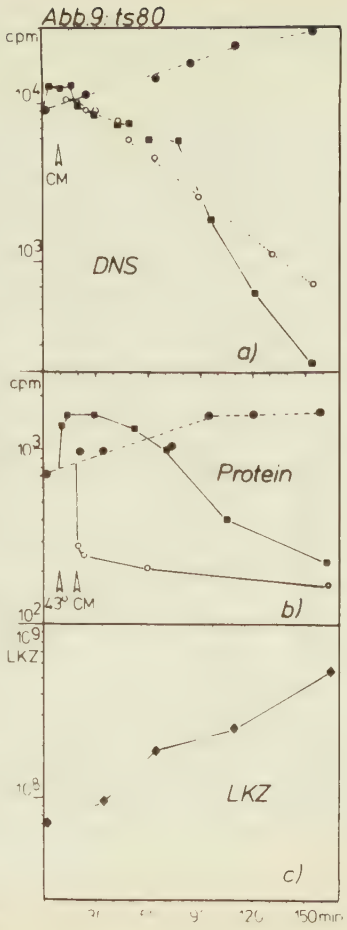


Abb 9: ts80

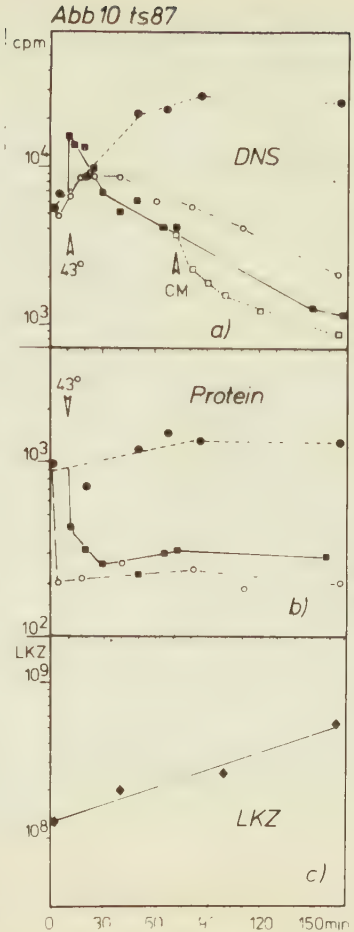


Abb 10 ts87

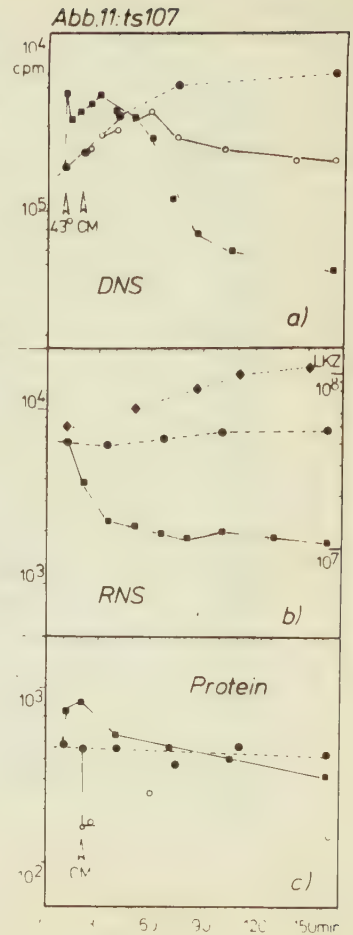
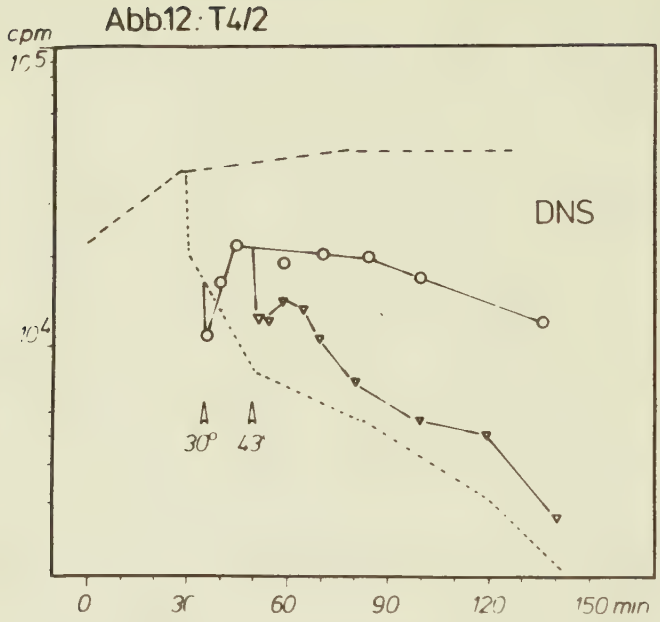


Abb.11: ts107



Legende zu den Abbildungen 12 - 21:

Pulsexperimente zur Messung der DNS- und Proteinsyntheserate bei Rückshift und Doppelshift. Zum besseren Vergleich sind einige Kurven der Abbildungen 2 - 11 wiederholt eingezeichnet. Bei diesen Kurven sind die Meßpunkte nicht mehr angegeben.

—▲— 43°-30°, —▽— 43°-30° - CM,

—△— 43°-30°-43°,

Zur Erklärung der übrigen verwendeten Symbole siehe die Legende zu den Abbildungen 2 - 11 (Seite 102).

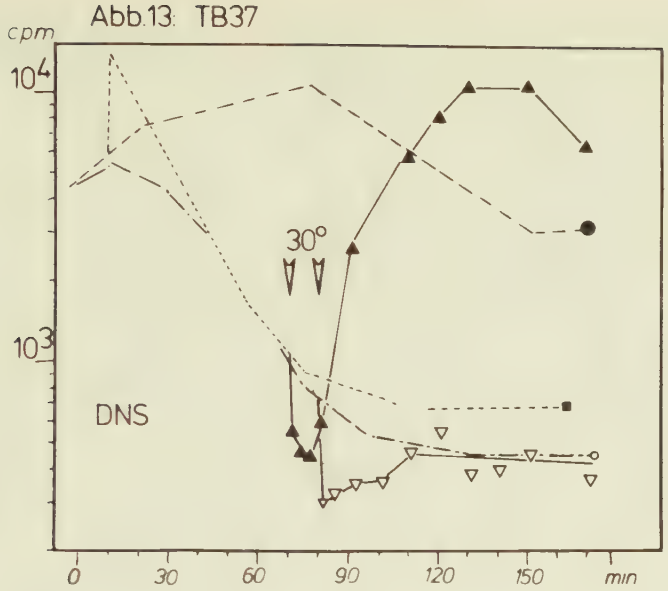


Abb.13: TB37
cpm
10^4
10^3
30°
DNS
0
30
60
90
120
150
min

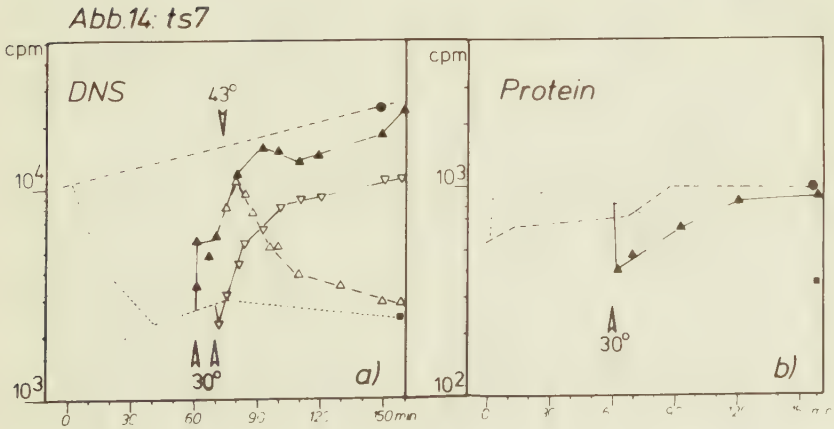


Abb.14: ts7
cpm
DNS
43°
30°
a)
cpm
Protein
30°
b)

Abb. 13 und 14

Abb.15: ts13

Abb.16: ts40

Abb. 15 und 16

Abb.17: ts66

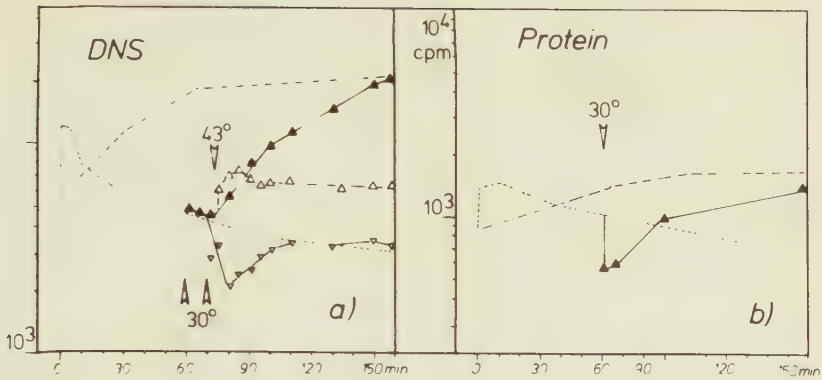


Abb.18: ts77

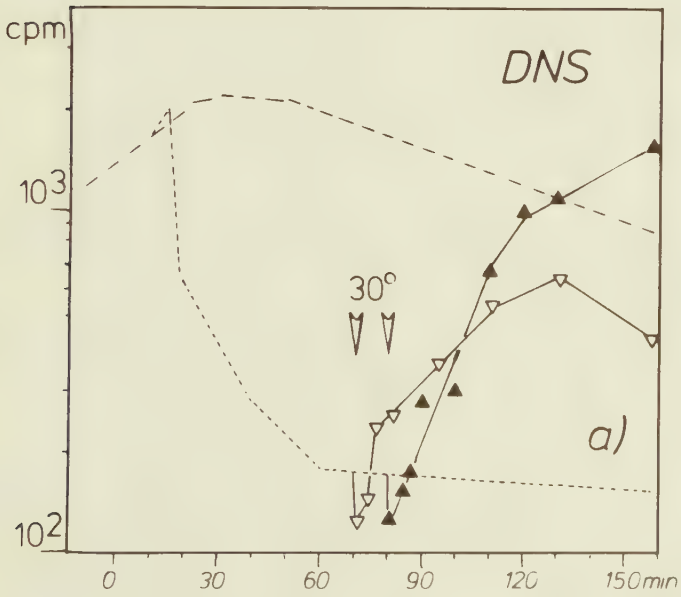


Abb. 17 und 18

Abb.19: ts80

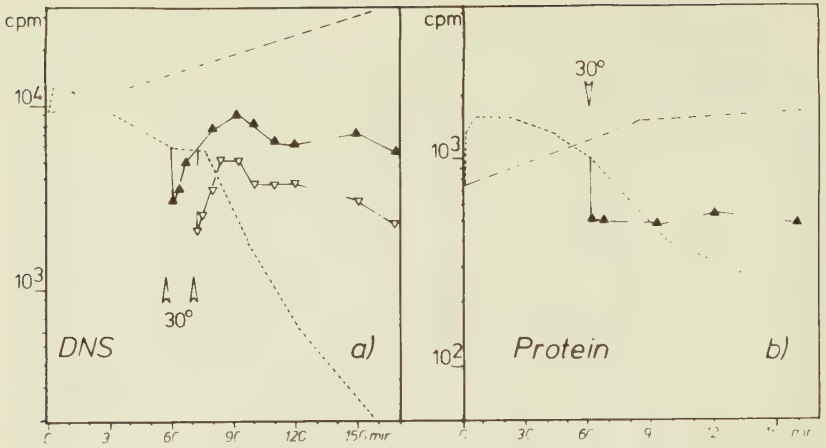


Abb.20: ts87

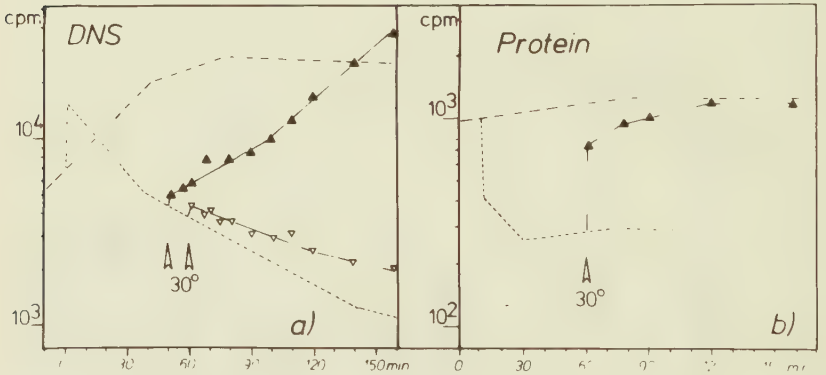


Abb.21: ts107

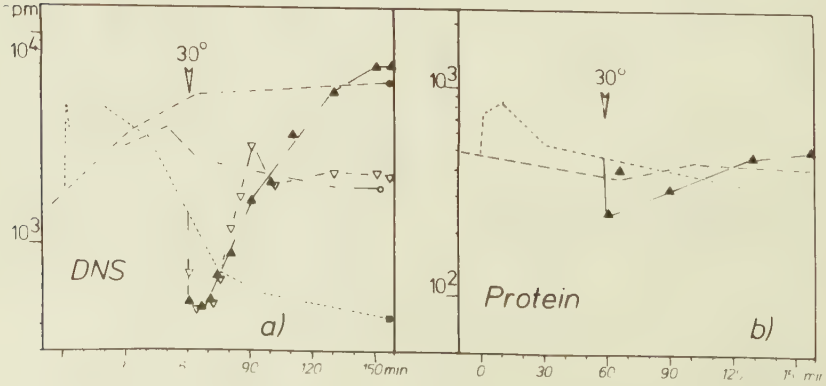


Abb. 19 - 21

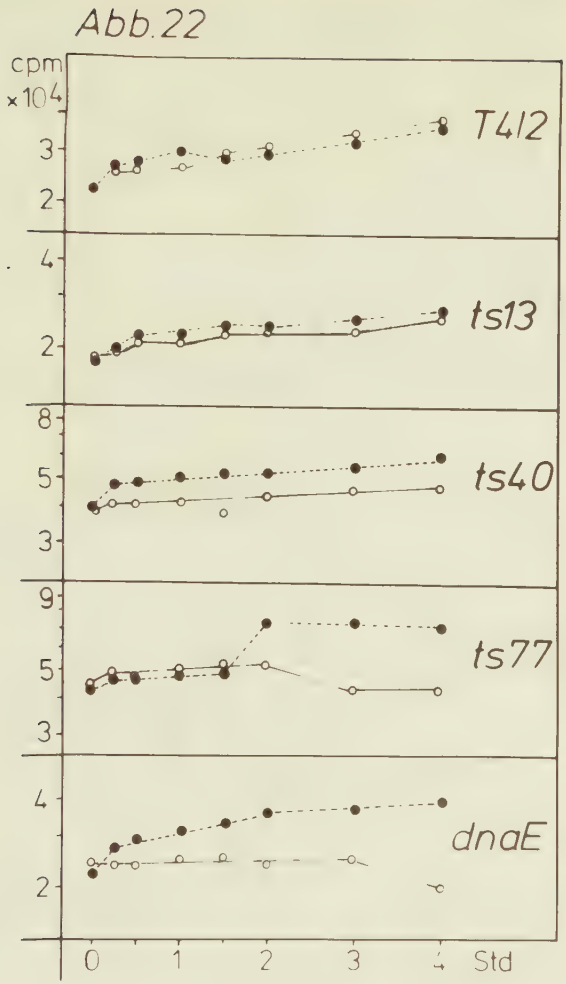


Abb. 22: Stabilität der DNS bei 30° und 43°:
Pulse-chase-Experiment mit ^{3}H-Thd beim WT T4/2 und den Mutanten ts13, ts40 und ts77, sowie der dnaE-Mutante von E.coli.
●———● 30°, O———O 43°

Abb.23: T4I2

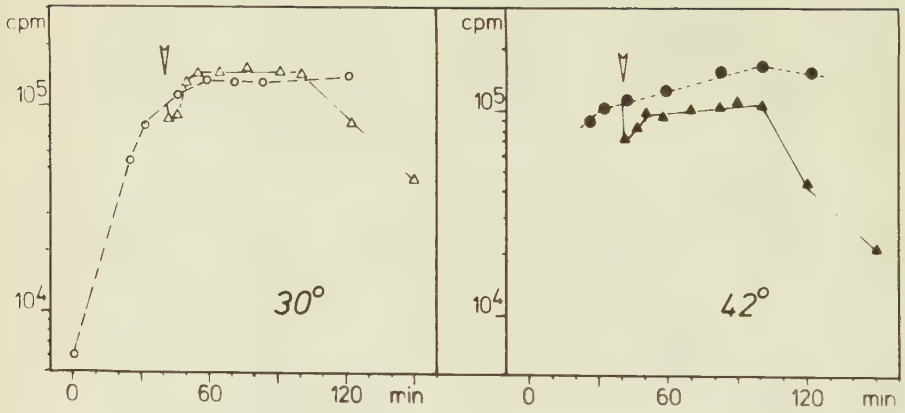


Abb.24: ts7

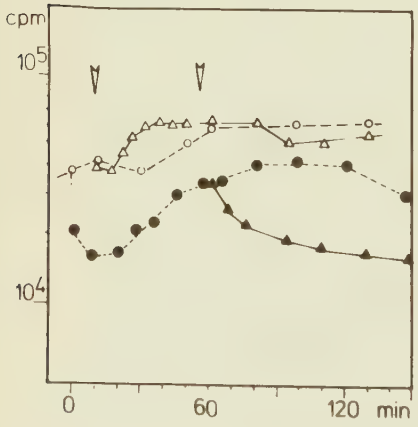
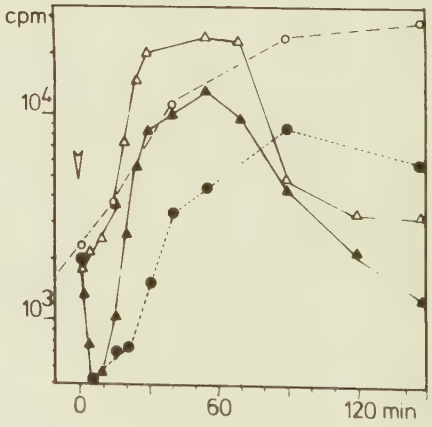


Abb.25: ts13



Legende zu den Abbildungen 23 - 28:

Replikation der P22-Phagen-DNS bei 30° und 42° im Pulsexperiment:
Der Zeitpunkt der Phagenzugabe ist mit einem Pfeil markiert.

O—O 30°-Kontrollkultur, ●—● 42°-Kontrollkultur,
△—△ 30° infizierte K., ▲—▲ 42° infiz. Kultur

Abb.26: ts40

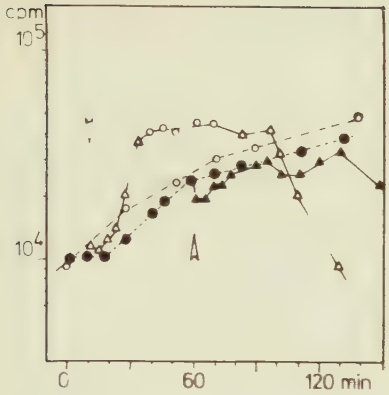


Abb.27: ts77

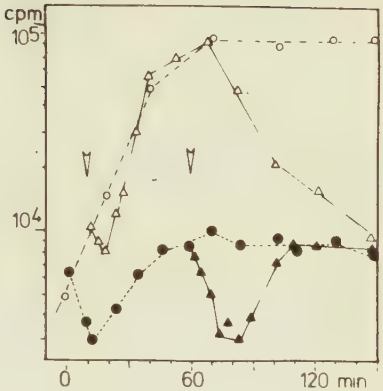


Abb.28: ts107

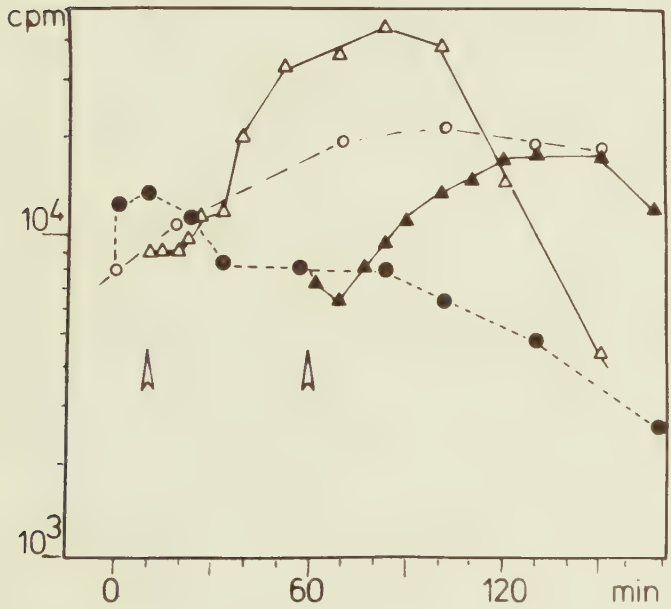


Abb. 26 - 28

Abb. 29

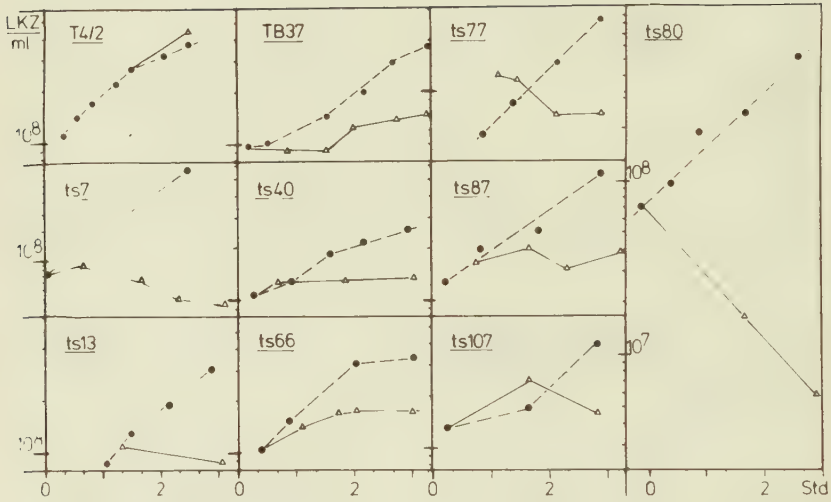


Abb. 29: Lebendkeimzahlbestimmung aus wachsenden Kulturen (Minimalmedium bei 30° und 43°).

●——● 30°, △——△ 43°

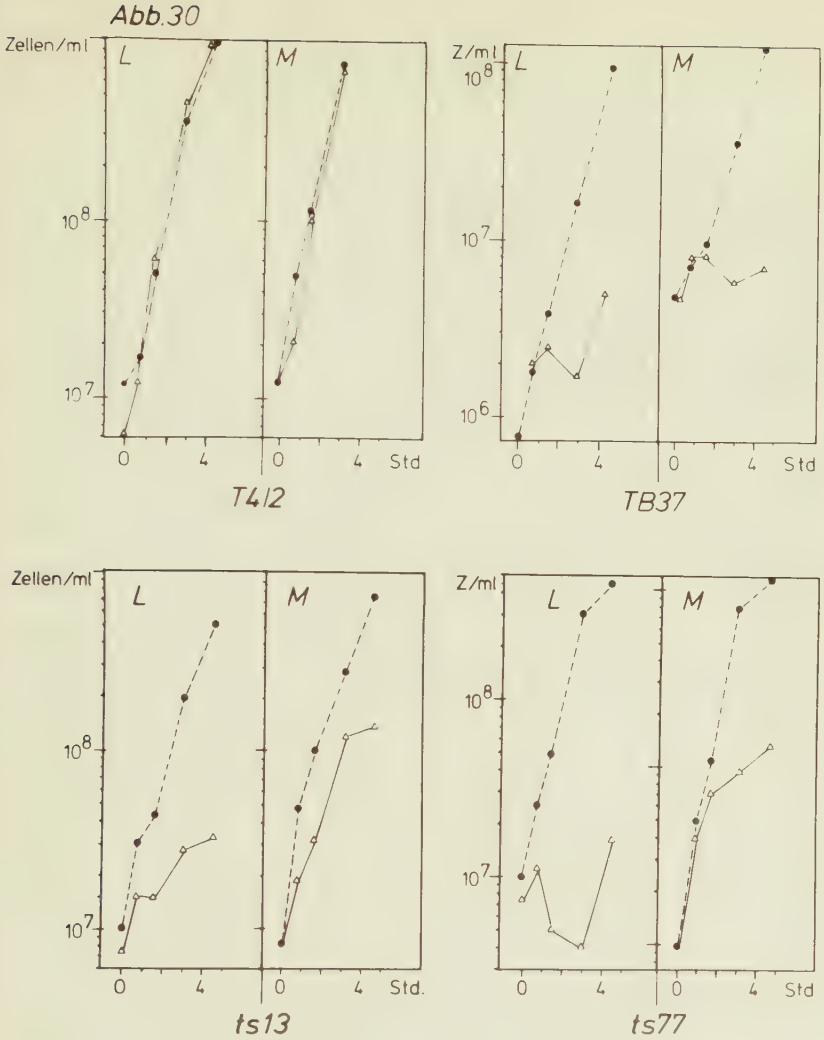


Abb. 30: Lebendkeimzahlbestimmung und mikroskopische Zählung aus wachsenden Kulturen (Vollmedium bei 30° und 43°).
L - Lebendkeimzahl, M - mikroskopische Zählung;
●——● 30°, △——△ 43°

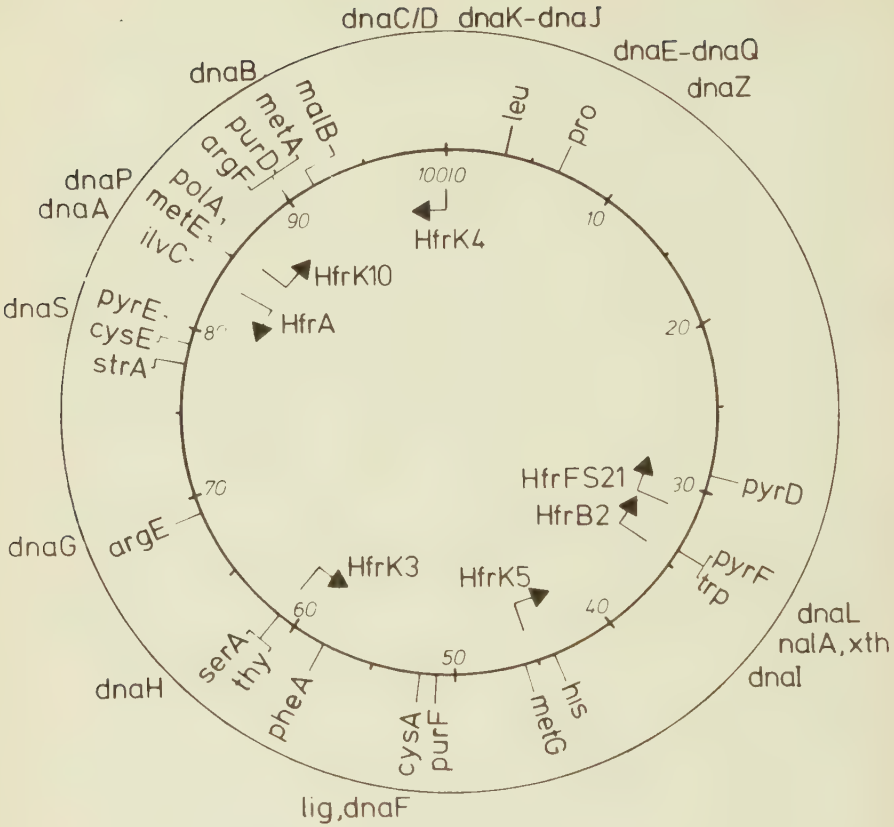


Abb. 31: Verkürzte Genkarte von Salmonella tm. und ihrer Hfr-Stämme (nach Sanderson 1972 und Sanderson und Hartmann 1978):
Außerhalb des äußeren Kreises ist an den analogen Kartenpositionen die ungefähre Lage einiger dna-Genorte von E.coli angegeben (nach Bachmann et al 1976, Sevastopoulos et al 1977, Saito und Uchida 1978 und Horiuchi et al 1978).

Am Ende dieser Arbeit möchte ich all denen danken, durch deren Hilfe die Durchführung erst möglich wurde, allen voran jedoch Herrn Professor Dr. Horst Schmieger für die stete Diskussionsbereitschaft und die intensive Beratung bei der Planung der Versuche und bei der Interpretation der Ergebnisse.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch Frau U. Schanda-Mulfinger und allen anderen Labormitgliedern für die psychische und praktische Hilfe bei auftretenden Problemen, sowie meinem Vater für die aktive Hilfe beim Schreiben der Arbeit.

Danken möchte ich auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft, und nicht zuletzt Dr. Bachmann, Dr. Sanderson, Dr. d'Ari und Dr. Bagdasarian für die zur Verfügung gestellten Phagen- und Bakterienstämme.

Lebenslauf

Am 26. Mai 1949 wurde ich in Landshut/Niederbayern geboren. Meine Eltern sind Hildegard Schwarz, geb. Hummel, und Robert Schwarz. Von 1955 - 1959 besuchte ich die Grundschule Bayrisch-Gmain/Ldkr. Berchtesgadener Land, anschließend den humanistischen Zweig des Karlsgymnasiums Bad Reichenhall, wo ich 1969 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1969 begann ich das Studium der Mikrobiologie an der Technischen Universität München, das ich 1975 mit der Diplomprüfung für Biologen abschloß. Meine Diplomarbeit führte ich, ebenso wie die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Genetischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Schmieger durch.